



HAL
open science

Biomarqueurs émergents dans le cancer de prostate : à propos de la β -tubuline de classe III et du score urinaire PCA3

Guillaume Ploussard

► **To cite this version:**

Guillaume Ploussard. Biomarqueurs émergents dans le cancer de prostate : à propos de la β -tubuline de classe III et du score urinaire PCA3. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT : 2011PEST0098 . tel-00920469

HAL Id: tel-00920469

<https://theses.hal.science/tel-00920469v1>

Submitted on 18 Dec 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ PARIS 12
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS EST CRETEIL**

2011

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XII

Champ disciplinaire: Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie
Ecole doctorale de rattachement : Sciences de la Vie et de la Santé (SVS)

Présentée et soutenue publiquement par:

Guillaume PLOUSSARD

Le 12/12/2011

**Biomarqueurs émergents dans le cancer de prostate : à
propos de la β -tubuline de classe III et du score urinaire
PCA3**

JURY:

Président : Pr François DESGRANDCHAMPS

Rapporteurs : Pr Yves ALLORY
Pr Pierre MONGIAT-ARTUS

Examineurs : Pr Karim FIZAZI

Directeurs de thèse: Pr Francis VACHEROT
Pr Alexandre de la TAILLE

Sommaire

Introduction et objectifs du travail de thèse

Introduction

I. Le cancer de prostate (CaP)

I.1. Epidémiologie

I.2. Stimulation du tissu sain et tumoral : l'hormonodépendance

I.3. Facteurs de risque du CaP

I.4. Histoire naturelle du CaP

I.5. Classifications pathologiques et pronostiques du CaP

1. Stade tumoral

2. Classification histologique

3. Autres facteurs pronostiques

I.6. Traitement du CaP

1. Formes localisées et localement avancées

A. Localisées

B. Localement avancées

2. Formes métastatiques et traitement hormonal

I.7. Résistance à la castration

1. Récepteurs des androgènes

2. TP53

3. Bcl-2

4. Différenciation neuro-endocrine

I.8. Prise en charge de la maladie résistante à la castration

1. Modifications hormonales : Lesquelles ? Jusqu'à quand ?

2. Chimiothérapie : Laquelle ? Quand débiter ?

A. Docétaxel

B. Nouvelles perspectives

II. Biomarqueurs pronostiques du CaP

II.1. Un marqueur biologique de référence : le PSA

1. Le PSA

2. Variations autour du PSA total

(i). Rapport PSA libre/total

(ii). Vitesse

II.2. Biomarqueurs tissulaires

II.3. Biomarqueurs sériques

II.4. Biomarqueurs urinaires

1. Marqueurs d'ADN

2. Marqueurs d'ARN

3. Marqueurs protéiques

II.5. Perspectives

III. β -tubuline de classe III : généralités et rôle dans la chimiorésistance

III.1. Microtubules et tubulines

III.2. Agents cytotoxiques ciblant les microtubules

III.3. Mécanismes de chimiorésistance

1. Surexpression de la pompe transmembranaire (gène ABCB1)
2. Inhibition des voies de l'apoptose
3. Mutations somatiques du gène de la β -tubuline I
4. Rôle des MAPs
5. Altération du cytosquelette
6. Surexpression des isotypes de la β -tubuline

III.4. β -tubuline de classe III et impact de sa surexpression dans les tissus cancéreux sur la chimiorésistance

1. Données *in labo*, mécanisme de résistance dans les lignées cellulaires
2. Données cliniques, association entre expression de la β -tubuline III et pronostic
3. β -tubuline de classe III et cancer de prostate

IV. Gène PCA3 et score urinaire dérivé

IV.1. Généralités

IV.2. Intérêt diagnostique prouvé : prédiction de la positivité des biopsies prostatiques

IV.3. Intérêt pronostique évoqué : corrélation à l'agressivité du CaP

Résultats

Présentation des articles scientifiques

Discussion et Perspectives

Bibliographie

Résumé

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement mon Jury de thèse, pour avoir accepté de juger mon travail. Veuillez trouver en ce travail l'expression de ma reconnaissance.

- A Monsieur le Professeur François Desgrandchamps. Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse, merci pour le soutien au cours de mon internat, et pour la confiance accordée pour mon post-internat. Merci pour cette « maison du bonheur » que représente votre service d'Urologie au jour le jour.

- A Monsieur le Professeur Alexandre de la Taille. Merci pour la qualité de ton encadrement, pour ton soutien constant et ta confiance. Ton rôle dans ma formation et dans mon cursus a été et restera fondamental.

- A Monsieur le Professeur Francis Vacherot. Un accompagnement en or dans la « vie intérieure » de la recherche fondamentale. Merci de rendre la recherche motivante, souriante et efficace ; et de t'être adapté à mon faible niveau de chirurgien-chercheur pour ne pas m'affoler trop tôt.

- A Monsieur le Professeur Pierre Mongiat-Artus. Merci pour ton soutien, tes conseils et ta disponibilité de chaque instant. Avec toi, les mots « pédagogie » et « universitaire » prennent un peu plus de sens.

- A Monsieur le Professeur Yves Allory. Merci pour tous les conseils avisés et enseignements sur un sujet au départ obscur pour un chirurgien : l'anatomopathologie. Et d'avoir quitter par moments la sphère urothéliale pour m'apporter un peu de solidité pathologique sur la maladie prostatique.

- A Monsieur le Professeur Karim Fizazi. Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Votre importante expérience de la maladie tumorale prostatique, de ses mécanismes de résistance à

la castration et des thérapeutiques qui en découlent éclairera au mieux les résultats de ce travail.

Je tiens également à remercier,

- Paul et sa maman. Pour le bonheur sans cesse renouvelé de construire une vie pour vous et à vos côtés. Sandra, ton amour et ton soutien sont si précieux.

- Mes parents. Pour tout. Juste pour tout. Pour votre amour, votre dévouement, et pour m'avoir transmis l'envie de soigner.

- Ma famille et mes sœurs, Alexandra, Laure-Emmanuelle, Marielle.

- Mes beaux-parents, Chantal et Henri ; David. Beaucoup de mes pensées au cours de la dernière ligne droite de cette thèse sont allées vers vous. Vous m'avez accueilli, à mon tour d'être présent à vos côtés.

- L'ensemble de l'équipe 7. Merci pour vos sourires, votre professionnalisme, votre enthousiasme. Spéciale dédicace à celles et ceux sans lequel(le)s mon travail aurait été impossible à réaliser : Stéphane, Nanor, Corine, Pascale(s), Laurence. Merci à Carlosse, Josselin, Asma, Asmaa, Justine, Nathalie, Julia, Franck, Catherine, Venise, Edwige, Mamadou.

- Big up à la Urology M2 Dream Team, la tradition est en marche : Laurence, Evangelos, Xavier.

- Mes amis, toujours présents après tant d'années, et en particulier Damien, Hugues, Edouard, Mathieu, Romain, Mélanie, Raph, Julie, Anaïs, Delphine ; les Lauze, et tous les autres.

- Tous mes amis du milieu, et particulièrement : Kien, Vidal, Olivier, Ambroise, Yannick, Véronique, Alexandre, Pascal, Norman, Damien, Laure, Gilles, Julie, Louis, Ghassen.

- L'équipe d'Urologie de l'hôpital Saint-Louis, médicale et paramédicale (la maison du bonheur) ; l'ensemble de mes maîtres d'internat, en particulier Laurent Salomon, des praticiens et des chefs de clinique, qui m'ont enseigné la chirurgie et accompagné durant ce parcours. L'excellence doit sûrement être l'addition de tous ces petits plus que vous apportez.

Introduction et objectifs généraux du travail de thèse

Le cancer de la prostate (**CaP**) pose un problème de santé publique par sa fréquence et par sa gravité. Il est le cancer masculin le plus fréquent. Dans le monde, 670 000 nouveaux cas sont dénombrés chaque année dont 395 000 en Europe. En 2010, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en France était supérieur à 70 000, tandis que le nombre de décès avoisinait les 9200 cas. Son incidence est en forte augmentation (+8,5% par an entre 2000 et 2008) (Belot et al., 2008).

La problématique d'un dépistage de masse se pose légitimement, puisque le CaP remplit un certain nombre des critères définis par l'OMS guidant la mise en place d'un tel programme : il représente un problème de santé publique, le stade latent et curable de la maladie est identifiable, l'histoire naturelle de la maladie est comprise, les tests diagnostiques sont acceptables.

De plus, l'impact sur la réduction de la mortalité a été précisé récemment par l'étude européenne ERSPC qui observe, après un délai de 9 ans, une réduction de la mortalité par cancer de prostate de 27% pour les hommes de 55 à 69 ans ayant effectué un dépistage systématique par dosage du PSA (Schröder et al., 2009). Enfin, le volet suédois de cette étude a montré une réduction de 49% à 10 ans du risque de maladie métastatique, impactant la qualité de vie. Les recommandations concernant le dépistage du CaP par dosage de PSA vont probablement évoluer dans le sens d'une généralisation, comme en témoigne le communiqué cosigné par l'HAS (Haute Autorité de Santé), L'INCa (Institut National du Cancer) et l'AFU (Association Française d'Urologie) en mars 2009.

Les agences d'évaluation en santé ne se sont pas encore prononcées pour l'organisation d'un programme de dépistage de masse, déjà réalisé de fait : un rapport de l'OPEPS (Office Parlementaire d'Evaluation des Politiques de Santé) révèle que plus de 80% des médecins généralistes pratiquent un dépistage individuel par dosage du PSA.

Cependant, le dépistage expose à un risque de sur diagnostic et de sur-traitement. Le CaP est classé dans un groupe de bon pronostic par l'INCa. La survie globale est de 88% à 1 an et 80% à 5 ans, la survie spécifique de 94% et 80%. Le sur-traitement est estimé de manière très variable entre 27 et 84% selon la population ciblée, la fréquence de répétition des tests (Schröder et al., 2009). Entre 6 et 27% des patients qui subissent une prostatectomie totale

auraient un profil de tumeur identique à celui retrouvé incidemment lors d'autopsies (Humphrey et al., 1996). Le dépistage expose les patients à un risque de traitement discutable sur le plan carcinologique et morbide (dysfonction érectile, incontinence, morbidité post radicale).

Le challenge des urologues dans les prochaines années sera d'identifier les patients atteints de CaP à très faible risque de progression, pour lesquels la proposition de traitement curatif radical pourra être contrebalancée par la proposition d'une attitude de « surveillance active ». La surveillance active consiste à encadrer le suivi des patients atteints de CaP à faible risque de progression dans le but de leur épargner les conséquences fonctionnelles d'un traitement curatif, tout en pouvant identifier à temps des signes d'évolutivité de la maladie afin de ne faire subir aucune perte de chance au patient en cas de progression du CaP. La surveillance active est depuis quelques années un traitement validé du CaP à faible risque (Heidenreich et al., 2011). Cependant, les critères initiaux au diagnostic de faible risque évolutif ne sont pas clairement identifiés, et ils varient de façon importante en fonction des centres. Les urologues se basent essentiellement sur les données du toucher rectal (stade T1c, voire T2a), la valeur du PSA (>10 ou 15ng/ml), la densité du PSA (<15 ou 20 ng/ml/gr) et des critères biopsiques extrêmement variables selon les centres (<3 carottes envahies ou <33% des carottes envahies, <3 mm de cancer par carotte ou <50% de cancer par carotte). Cette variabilité souligne l'imperfection de la combinaison de ces critères pour identifier de manière formelle un CaP non significatif. Un CaP non significatif a été défini par Epstein comme un CaP de bas grade (score de Gleason 6 maximum), intraprostatique, et de faible volume (<0.5 ml), et cette notion s'applique aux CaP qui n'auront de progression clinique ou biologique au cours de la vie du patient, et donc conceptuellement, le traitement serait inutile (Bastian et al., 2004). De nombreuses études ont cependant insisté sur la sous-classification pré-opératoire en CaP à faible risque d'environ 20-25% de CaP à risque élevé de progression (Ploussard et al., 2010a, Suardi et al, 2008).

De nouveaux moyens pronostiques sont donc nécessaires pour le diagnostic du CaP afin d'identifier les CaP non significatifs, meilleurs candidats à la surveillance active (Ploussard et al., 2011b). L'amélioration des outils pronostiques disponibles permettrait également de mieux distinguer les cancers évolutifs des cancers latents réduisant ainsi les coûts de la prise en charge tout en assurant la qualité de celle-ci.

La gravité de l'atteinte prostatique est liée à la fréquence des métastases puisqu'il est admis qu'environ 5% des patients sont d'emblée en phase métastatique et que 20-40 % des patients

chez lesquels le diagnostic est porté au stade localisé présenteront secondairement des métastases après récurrence d'un premier traitement local. Depuis les travaux de Charles Huggins en 1942, qui a démontré la sensibilité du tissu prostatique aux androgènes, le traitement de la forme avancée du CaP, est basé sur la privation androgénique. La phase métastatique comporte deux étapes successives. Au cours de la période initiale qualifiée d'hormono-dépendante, la réduction de la testostéronémie par agoniste de la LHRH ou l'administration d'anti-androgènes permet d'obtenir une amélioration de la symptomatologie et une réduction du volume tumoral dans 80 à 90 % des cas, associée le plus souvent à une diminution voire une normalisation du taux de PSA. Cette première phase n'est que transitoire puisqu'un phénomène d'échappement hormonal se produit inéluctablement dans un délai de 18 à 36 mois. Le patient entre alors en phase de résistance à la castration caractérisée par la reprise évolutive de la maladie, l'élévation des taux de PSA précédant de plusieurs mois la symptomatologie clinique dans au moins deux tiers des cas malgré un taux de testostérone <50 mg/dL et après avoir vérifié l'absence d'effet paradoxal ou bénéfique d'un anti-androgène. Jusqu'au milieu des années 90, la chimiothérapie avait une place limitée dans le traitement du CaP au stade de l'échappement hormonal. Le CaP était considéré par les spécialistes comme « chimio-résistant ». Depuis 2004, des approches thérapeutiques utilisant des poisons du fuseau mitotique, en particulier le docetaxel, ont prouvé une efficacité sur la survie globale et ont fait évoluer le traitement du cancer hormono-résistant (Petrylak et al., 2004; Tannock et al., 2004). En effet, le docetaxel s'impose aujourd'hui comme un nouveau standard du traitement du CaP hormono-résistant. Cependant, tous les patients résistants à la castration n'auront pas la même réponse clinique au docétaxel, et certains d'entre eux progresseront rapidement sous chimiothérapie. Par ailleurs, la communauté scientifique voit arriver depuis 2 ans un grand nombre de nouvelles drogues qui bouleverseront probablement la prise en charge du CaP résistant à la castration, à la fois par de nouvelles chimiothérapies (cabazitaxel) et par de nouvelles hormonothérapies (abiratérone, MDV3100). L'arrivée de ces nouvelles drogues permettra probablement une prise en charge plus individualisée du CaP résistant à la castration. Cependant, cette évolution vers une abondance de biens nécessitera une meilleure connaissance de la sensibilité de chaque patient à ces drogues.

Il sera donc nécessaire de développer des marqueurs prédictifs afin de mieux évaluer la réponse des patients à chaque traitement, améliorant ainsi leur prise en charge. Il faudra également décrypter les voies moléculaires impliquées à la fois dans la résistance à l'hormonothérapie, la chimiothérapie et plus généralement la résistance à l'apoptose afin de mieux individualiser la prise en charge du CaP avancé. L'identification de nouveaux

biomarqueurs permettra d'étudier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer des agents pharmacologiques efficaces pouvant re-sensibiliser les cellules à l'hormonothérapie ou à la chimiothérapie.

Introduction

I. Le cancer de la prostate

I.1 Epidémiologie

Le cancer de prostate (CaP) est le cancer masculin le plus fréquent. Dans le monde, 670 000 nouveaux cas sont dénombrés chaque année dont 395 000 en Europe. En 2010, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués en France était supérieur à 70 000. Son incidence est en forte augmentation (+8,5% par an entre 2000 et 2008) (Belot et al., 2008). Un homme né en 1940 a presque une chance sur 5 d'avoir un cancer de prostate avant 75 ans. Le cancer de la prostate pose donc un problème de santé publique. En France, le vieillissement de la population et la mise en place progressive du dépistage par dosage du PSA sont les principaux facteurs de l'augmentation de l'incidence avec des cancers détectés de plus en plus précocement. En France, environ 9 000 décès par an sont attribués au cancer de la prostate, pour environ 70 000 nouveaux cas diagnostiqués par an, situant ainsi cette maladie au deuxième rang dans la mortalité par cancer, après le cancer pulmonaire. Ces chiffres sont respectivement de 270000 pour les Etats-Unis et 87000 pour l'Europe (Ferlay et al., 2010; Jemal et al., 2010). D'ici 2030, le nombre d'hommes de plus de 50 ans en France devrait augmenter d'environ 50% en même temps que la génération du baby-boom accède aux âges élevés. Bien que la mortalité spécifique du CaP soit en baisse (env 7%/an), ces données révèlent la place prépondérante que va prendre ce cancer dans un avenir proche. Si le cancer de la prostate touche plus particulièrement le sujet âgé, il est plus grave chez le sujet jeune avec une survie moins bonne chez les patients de moins de 50 ans. Une prédisposition génétique est présente dans 5 à 10 % des cas.

I.2 Stimulation du tissu prostatique sain et tumoral : l'hormonodépendance

Le tissu prostatique est hormono-dépendant. Son développement nécessite la présence du récepteur des androgènes fonctionnel et la sécrétion adaptée d'androgènes dont le métabolite actif est la 5 α dihydrotestostérone (DHT). L'importance de la DHT est démontrée lors d'un déficit en 5 α -réductase qui assure la transformation de la testostérone en DHT. Les expériences chez le rat et le chien ont montré que la masse totale de cellules prostatiques était dépendante

d'un niveau critique de DHT. Une hyper stimulation androgénique n'entraînait pas une croissance supplémentaire des cellules prostatiques une fois que la glande a atteint sa maturité. La prostate grossit et atteint son volume final vers l'âge de 20 ans environ. A l'âge adulte, elle est toujours dépendante des androgènes. Pour preuve, la castration entraîne une régression importante du tissu prostatique. Néanmoins, cette régression n'est pas complète car certaines cellules vont pouvoir résister à cette apoptose hormono-dépendante. Au sein de l'organisme, les androgènes sont produits notamment au niveau des cellules de Leydig du testicule, des glandes surrénales ou encore de la peau. Il faut noter que les glandes surrénales sécrètent des quantités importantes de précurseurs stéroïdiens inactifs tels que la DHEA, la SDHEA et l'androstènedione qui représentent 5 % des androgènes circulants. Ces précurseurs sont convertis ensuite en androgènes actifs au niveau des tissus périphériques (en particulier dans les cellules de la prostate).

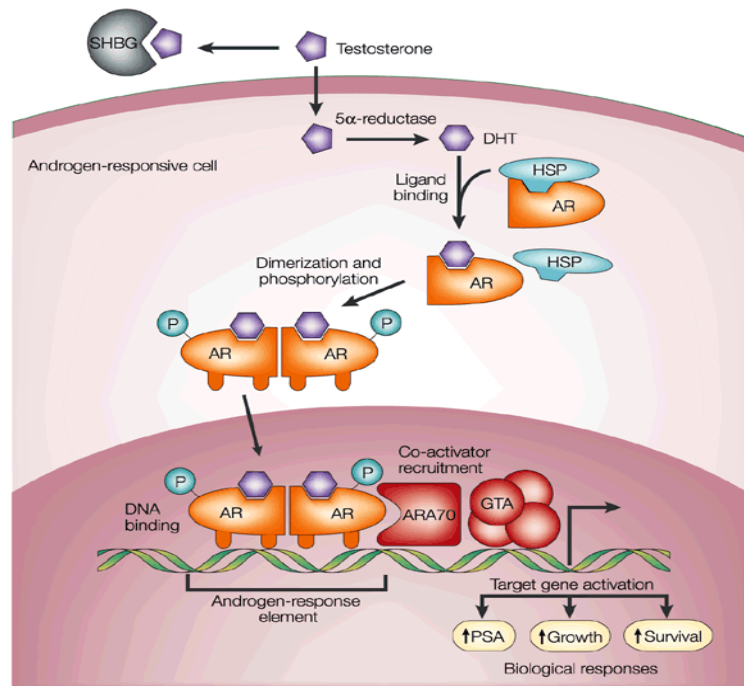
Les stéroïdes agissent sur de nombreux processus physiologiques allant de la prolifération à l'apoptose en passant par la différenciation et l'homéostasie. De nombreux travaux ont permis d'expliquer leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire et moléculaire sur les tissus cibles. Deux modes d'action ont été décrits et ont été considérés, jusqu'à récemment, comme indépendants. Historiquement, le premier mécanisme découvert emprunte la voie génomique. Celle-ci implique un récepteur intracellulaire, appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui agit comme un facteur de transcription (Beato et al., 1996 ; Beato and Klug, 2000 ; Germain et al., 2006). Dans ce cas, l'action des stéroïdes requiert la localisation nucléaire ou cytosolique des récepteurs, se produit dans un laps de temps allant de 30 minutes à plusieurs heures et implique les processus de transcription et de synthèse protéique. Ce processus est défini comme le mode d'action classique (ou génomique) des stéroïdes. Le deuxième mode d'action des stéroïdes est caractérisé par une réponse cellulaire rapide (de quelques secondes à quelques minutes), pouvant se produire à des concentrations en stéroïdes faibles, nécessitant très souvent la localisation membranaire des récepteurs et avec la particularité d'être insensible aux inhibiteurs de la transcription et de la traduction. Cette voie est classiquement décrite comme non génomique. Cette action rapide a été montrée pour l'ensemble des stéroïdes notamment les androgènes (Steinsapir et al., 1991). Ces deux voies distinctes sont importantes à connaître et seront revues brièvement dans le paragraphe traitant de la résistance à la castration.

Le récepteur des androgènes (RA) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires, qui comprend : les récepteurs des hormones thyroïdiennes (RT α et RT β), des œstrogènes (RE α et

RE β), de la progestérone (RP_A et RP_B), de la vitamine D (RVD), de l'acide rétinoïque (RAR et RXR), des minéralocorticoïdes (RM), des glucocorticoïdes (RG α et RG β) et des récepteurs dits « orphelins » pour lesquels les ligands ne sont pas encore connus. La structure des récepteurs nucléaires est caractérisée par quatre grands domaines dont un domaine de liaison à l'ADN (*DNA Binding Domain, DBD*) et de dimérisation et un domaine de liaison de l'hormone (*Ligand Binding Domain, LBD*).

Le récepteur des androgènes (Xq11-12, 110 kDa) est présent au niveau des cellules épithéliales sécrétoires et stromales mais est généralement absent des cellules basales (Nakada et al., 1993). Il est activé dans le cytoplasme, par son ligand naturel, la Dihydrotestostérone (DHT) dérivée de la testostérone circulante (**Figure 1**). La DHT a de 5 à 10 fois plus d'affinité pour le RA que la testostérone. Le changement de conformation induit par la fixation du ligand permet la libération de sa protéine chaperonne (HSP90), la dimérisation du récepteur et sa translocation dans le noyau où le RA est en mesure d'agir en tant que facteur de transcription *via* son domaine de fixation à l'ADN (DBD). Ce dimère se fixe alors au niveau des androgen-response éléments (ARE) et induit ainsi la transcription de nombreux gènes dont hKLK3 codant le PSA (Lee et al., 1995) (Henttu et al., 1992). La spécificité de la transcription implique non seulement le RA, les facteurs généraux de la transcription mais également des corégulateurs parmi lesquels on distingue des coactivateurs tels que ARA-54, ARA-55, ARA-70, Rb, la β -caténine et des co-répresseurs capables de moduler l'expression de gènes responsables de la différenciation ou de la croissance de la prostate (Heemers and Tindall, 2007; Heinlein and Chang, 2002) (<http://androgendb.mcgill.ca/ARIPmap.gif>). Ce mode d'action des androgènes est le mode classique dit « génomique » par opposition au mode non classique énoncé précédemment (Aarnisalo et al., 1999).

Figure 1. Action des androgènes : La testostérone circule dans le sang, où elle se lie à l'albumine et à la globuline; une partie reste libre. La testostérone libre pénètre dans les cellules prostatiques où elle est convertie en dihydrotestotérone (DHT) par la 5 α -réductase. La DHT se lie au RA ce qui entraîne la dissociation des protéines chaperonnes de choc thermique (HSPs-heat shock protein) et la phosphorylation du RA. Le RA se dimérise et se lie aux éléments de réponse aux androgènes situés dans la région promotrice des gènes cibles. Les co-activateurs et les corépresseurs se lient alors au complexe RA, facilitant ou empêchant, respectivement, son interaction dans le mécanisme général de la transcription (GTA). L'activation (ou la répression) des gènes cibles favorise des réponses biologiques incluant la croissance cellulaire, la survie et la production de PSA (antigène spécifique de la prostate). (D'après Feldman et al., 2001)



I.3 Facteurs de risques du CaP

A - L'âge :

Le risque de CaP augmente d'année en année après 50 ans. Comme pratiquement tous les cancers, l'âge est un facteur de risque important, le nombre de mutations potentiellement délétères augmentant avec le nombre de division cellulaire et donc avec l'âge du tissu. Plus de 70% des cancers sont diagnostiqués chez l'homme de plus de 65 ans. Les données autopsiques soulignent également la forte prévalence du CaP (80% parmi les plus de 80 ans). Cette forte prévalence introduit également la notion de significativité et d'indolence du CaP, plus que pour tous les autres cancers. En effet, tous les CaP n'évolueront pas vers une forme engageant le pronostic vital ou fonctionnel de l'individu. Cette notion prendra une place importante au cours de ce travail de thèse.

Les deux principaux facteurs de risque de CaP clairement établis sont :

B - Les antécédents familiaux:

Des antécédents familiaux du cancer prostatique augmentent de manière importante le risque de développer un cancer, et semble-il, à un âge plus jeune. Plus il y a d'apparentés atteints plus le risque augmente. Ainsi, selon Steinberg G.D. et collaborateurs (Steinberg et al., 1990), le risque relatif est de 2 si le patient a un parent du premier degré atteint mais de 8,8 en cas de parents du premier et deuxième degré atteints. Ainsi, en cas d'antécédents familiaux de CaP chez des apparentés au premier degré et/ou en cas de CaP diagnostiqué à un âge jeune, l'Association Française d'Urologie recommande un dépistage individuel systématique dès 45 ans ou 5 ans avant le cas familial le plus précoce.

Environ 10% des cancers de la prostate peuvent être attribués à des causes héréditaires suivant un modèle autosomique dominant (Carter et al., 1993). Des études de liaison et sur les jumeaux monozygotes ont permis d'isoler certains loci et gènes potentiellement impliqués dans les cancers prostatiques familiaux. Parmi ceux-ci : le locus HPC1 contiendrait un gène candidat, RNASEL (1q24-25), intervenant dans la réponse apoptotique au stress (Smith et al., 1996). Au niveau du locus HPC2 (17q11), ELAC2 pourrait réguler la prolifération cellulaire (Silva et al., 2006; Tavtigian et al., 2001). De même BRCA1 (17q21) et BRCA2 (13q12.3) ont été évoqués (Eeles, 1999). Ces deux gènes sont impliqués dans la réparation de l'ADN et l'expression génique. Ils prédisposent au cancer du sein héréditaire. D'autres locus pourraient contenir des gènes de prédisposition à savoir les locus HPCX (Xq27-28) (Xu et al., 1998) et PCAP (1q42-43) (Cancel-Tassin et al., 2001; Cussenot and Cancel-Tassin, 2004). Les résultats de ces études sont parfois discordants. Ceci suggère non seulement que les cancers héréditaires se développent sur un mode hétérogène mais également que ce processus est multifactoriel et certainement en relation avec un grand nombre de facteurs environnementaux.

C - L'origine ethnique :

L'incidence du cancer de la prostate est plus importante chez les populations afro-américaines ou afro-antillaises par rapport aux populations caucasiennes en France ou aux Etats-Unis (Jemal et al., 2010). Ainsi, parmi les hommes d'ethnie afro-antillaise, l'Association Française d'Urologie recommande un dépistage individuel systématique dès 45 ans.

D - D'autres facteurs sont évoqués, étudiés, sans que les données de la littérature actuelles ne puissent trancher sur leur lien avec l'incidence du CaP.

- Facteurs environnementaux :

L'environnement module le génome. Ainsi, les asiatiques vivants aux Etats-Unis ou en Asie développent moins de cancer de la prostate que les américains-caucasiens. Néanmoins, les asiatiques-américains ont un risque plus élevé que leurs homologues vivant en Asie. Ceci souligne l'importance des facteurs environnementaux sur la survenue du cancer de la prostate. Les données épidémiologiques de Guadeloupe soulignent l'impact probable du chlordécone, un insecticide oestrogénique, sur le risque de CaP (Multigner et al, 2010).

- Les androgènes :

Un taux de testostérone élevé a longtemps été considéré comme exposant à un risque supérieur à la normale (Shaneyfelt et al., 2000). Toutefois, ces données sont sérieusement remises en question aujourd'hui (Raynaud, 2006). L'activité de la 5 α -réductase est certainement un facteur important en association avec la production de DHT intracellulaire. Par exemple, Il a été remarqué que l'expression de variants alléliques A49T, V89L de la 5 α -réductase de type 2, dont l'activité métabolique est augmentée est associée à un risque accru de cancer de la prostate (Jaffe et al., 2000; Reichardt et al., 1995; Shibata et al., 2002).

- L'alimentation :

Comme facteurs incriminés pour favoriser le cancer de la prostate, on peut citer : une consommation importante de protéines animales, une alimentation trop riche en lipides (Greenwald and McDonald, 1997 ; Nelson et al., 2003). Parmi les facteurs protecteurs, on compte la consommation de certains caroténoïdes, en particulier le lycopène (Gann et al., 1999) bien que les données restent sujettes à caution (Kavanaugh et al., 2007). La consommation de choux, de soja, ou d'antioxydants tels que le sélénium (sélénométhionine) et la vitamine E (α -tocophérol) ou encore un taux élevé de vitamine D pourraient avoir des effets protecteurs (Nelson et al., 2003). Certaines de ces molécules sont à envisager en chimioprévention (Klein and Thompson, 2004). Cependant de larges études contradictoires sont venues nuancer ces constatations.

E- Chimioprévention du CaP

Le CaP est une cible idéale pour la chimioprévention étant donné son histoire naturelle et sa forte prévalence. Deux types de prévention sont à distinguer : la prévention primaire, qui a pour but de diminuer le risque d'apparition du CaP ; et la prévention secondaire, qui, une fois

que le CaP est diagnostiqué, vise à ralentir sa progression. Les deux cibles principales des études de prévention ont été l'inflammation et la stimulation hormonale. A l'heure actuelle, 6 larges études de chimioprévention ont été publiées, peu se sont révélées positives (**Tableau 1**).

Tableau 1. Principales études de prévention du CaP. (D'après Rittmaster et al., 2011)

<i>Etude</i>	<i>Population</i>	<i>Nombre de patients</i>	<i>Date de fin d'étude</i>	<i>Résultat</i>
Finastéride (PCPT)	>55 ans PSA<3	18 882	2003	- 24.8% de CaP
Rofecoxib (ViP)	50-75 ans PSA 2.5-10	15 000	2004	Etude arrêtée (toxicité)
Vitamine E et C (Physicians Health Study II)	>50 ans	14 641	2007	Pas de bénéfice
Sélénium/Vitamine E (SELECT)	>50 ans PSA<4	35 533	2008	Pas de bénéfice (sur-rique dans le bras selenium)
Dutastéride (REDUCE)	>50 ans PSA 2.5-10	8 231	2009	- 23% de CaP
Soja, Sélénium, Vitamine E (NCI Canada)	HGPIN	325	2010	Pas de bénéfice
Sélénium (NCI US)	>40 ans PSA<10 HGPIN	435	2010	Pas de bénéfice significatif
Torémifine	>30 ans PSA<10 HGPIN	1 590	2010	Pas de bénéfice significatif

Uniquement deux études ont démontré un bénéfice en termes de réduction du risque de CaP. Ces deux études, REDUCE et PCPT, évaluaient l'impact des inhibiteurs de la 5 α -réductase en prévention primaire (Andriole et al, 2010 ; Thompson et al., 2003). Il a été observé une réduction significative du risque relatif de détection de CaP d'environ 25%. Ces résultats intéressants ont été critiqués sur de nombreux points (effets secondaires, biopsies réalisées systématiquement au cours du suivi et non justifiées par les données clinico-biologiques). Les résultats de ces deux études soulignaient également une plus forte détection de CaP à haut risque (score de Gleason 7-10) dans les groupes de traitement recevant les inhibiteurs de la 5 α -réductase (Lucia et al., 2007). Le risque de sélection de CaP à plus haut risque par une

prévention par inhibiteurs de la 5 α -réductase a provoqué un refus d'obtention d'autorisation de mise sur le marché de ces deux médicaments par la FDA américaine dans le cadre de la prévention du CaP, fin d'année 2010. Elle a même émis un avis défavorable sur le finastéride concernant le risque de développer un CaP plus agressif en juin 2011.

I.4 Histoire naturelle du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate se développe le plus souvent à partir de la portion périphérique de la glande à distance de l'urètre. La première phase de cancer correspond à la forme localisée du cancer, c'est-à-dire un cancer sans extension au-delà de la capsule prostatique. Il est généralement admis que les cellules tumorales dérivent de cellules normales, bien différenciées provenant de l'épithélium prostatique qui, sous l'action de facteurs tumorigènes (prédisposition génétique, facteurs environnementaux...) subissent des modifications précancéreuses aboutissant à un carcinome *in situ*, puis à un carcinome devenant plus agressif avec une perte de différenciation. L'extension du cancer se fait localement par envahissement de la glande prostatique qui précède le franchissement de la capsule prostatique. Il devient métastatique par voie hématogène et/ou lymphatique. Le premier site métastatique est l'os, après envahissement des chaînes ganglionnaires iliaques.

Longtemps cliniquement muet, un toucher rectal peut permettre de diagnostiquer le cancer de la prostate à un stade encore localisé. Le dosage de l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA) constitue un moyen de détection efficace car sa concentration plasmatique s'élève dans la grande majorité des cancers prostatiques. En cas de suspicion clinique (toucher rectal anormal) ou biologique (PSA >4 ng/ml), le diagnostic repose sur les biopsies prostatiques.

La gravité de l'atteinte prostatique est liée à la fréquence des métastases puisqu'il est admis que 5% des patients sont d'emblée en phase métastatique et que 20 à 30 % des patients chez lesquels le diagnostic est porté au stade localisé présenteront secondairement des métastases après récurrence (Lubeck et al., 1996 ; Pound et al., 1999).

Actuellement, à la faveur du dépistage par le PSA, la majorité des CaP sont diagnostiqués au stade localisé. Pour bien cerner le potentiel évolutif de ces formes localisées

après traitement, 3 groupes à risque différent de progression ont été établis: les groupes à bas risque, risque intermédiaire et haut risque de récurrence (locale ou à distance). La répartition dans chaque groupe est fonction de différents critères clinico-pathologiques qui ont été développés par d'Amico, dans un but de comparaison des études de suivi, quelque soit le traitement local proposé (D'Amico et al., 2004; Freedland et al., 2005; Ravary et al., 2000). Cette classification pré-traitement est très utile pour établir un risque individuel, mais elle est également critiquée car imparfaite. Ainsi, d'autres outils pronostiques notamment statistiques ont été développés ces dernières années, en particulier les *nomograms*, afin d'aider le clinicien à prédire le risque de récurrence après traitement, permettant d'améliorer les choix thérapeutiques (Kattan et al., 1998; Kattan et al., 1999) <http://www.nomogram.org/>. Ces outils pronostiques établissent un risque de récurrence en fonction de critères entrés dans le modèle statistique (données cliniques, PSA, biopsiques). Comme tout modèle statistique, ils ne peuvent prévoir avec certitude un risque individuel. Des nomogrammes pré-traitement et post-opératoires, basés sur les résultats pathologiques de la pièce de prostatectomie ont été publiés (Kattan et al, 1999 ; Stephenson et al., 2005 ; Donovan et al., 2011). Tous sont imparfaits, établis à partir de cohortes difficilement généralisables, et soulignent le besoin de meilleurs marqueurs pronostiques, afin de mieux évaluer le risque de progression ultérieure et de fait, de mieux individualiser le suivi et la nécessité éventuelle de traitement adjuvant.

I.5 Classifications pathologiques et pronostiques des cancers de la prostate

I. 5.1 Le stade tumoral

Le système TNM proposé par l'UICC (union internationale contre le cancer) s'adresse à la plupart des tumeurs malignes de localisation diverse. Il prend en compte l'extension de la tumeur primitive (T1 à T4), l'envahissement des ganglions régionaux (N0 à N3) et la présence ou non de métastases à distance (M0 à M1). Le **Tableau 2** décrit les détails de la classification TNM pour le cancer de la prostate.

Tableau 2 : Classification TNM pour le cancer de la prostate

TX	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primaire
T0	Pas de signe de tumeur primaire
T1	Tumeur cliniquement inapparente, non palpable, non visible par imagerie médicale
T1a	Tumeur découverte de manière fortuite par histologie (< 5 % de copeaux de résection)
T1b	Tumeur découverte de manière fortuite par histologie (> 5 % de copeaux de résection)
T1c	Tumeur diagnostiquée par biopsie à l'aiguille (par exemple à cause d'un niveau élevé de PSA)
T2	Tumeur limitée au tissu prostatique (apex et capsule compris)
T2a	Atteinte de moins de 50 % d'un lobe
T2b	Atteinte de plus de 50 % d'un lobe
T2c	Atteinte des deux lobes
T3	Tumeur envahissant la capsule
T3a	Envahissement extracapsulaire unilatéral ou bilatéral
T3b	Envahissement d'une ou des deux vésicules séminales
T4	Tumeur fixée aux tissus avoisinants ou envahissement des organes voisins autres que les vésicules séminales: col vésical, sphincter externe, rectum, muscle releveur et/ou plancher pelvien
NX	Renseignements insuffisants pour classer l'atteinte des ganglions régionaux
N0	Absence de ganglions régionaux positifs
N1	Métastase au niveau des ganglions régionaux
MX	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
M0	absence de métastases à distance
M1	Métastases à distance
M1a	Ganglions non régionaux
M1b	Métastases osseuses
M1c	Autre(s) métastase(s)

I. 5.2 Classification histologique

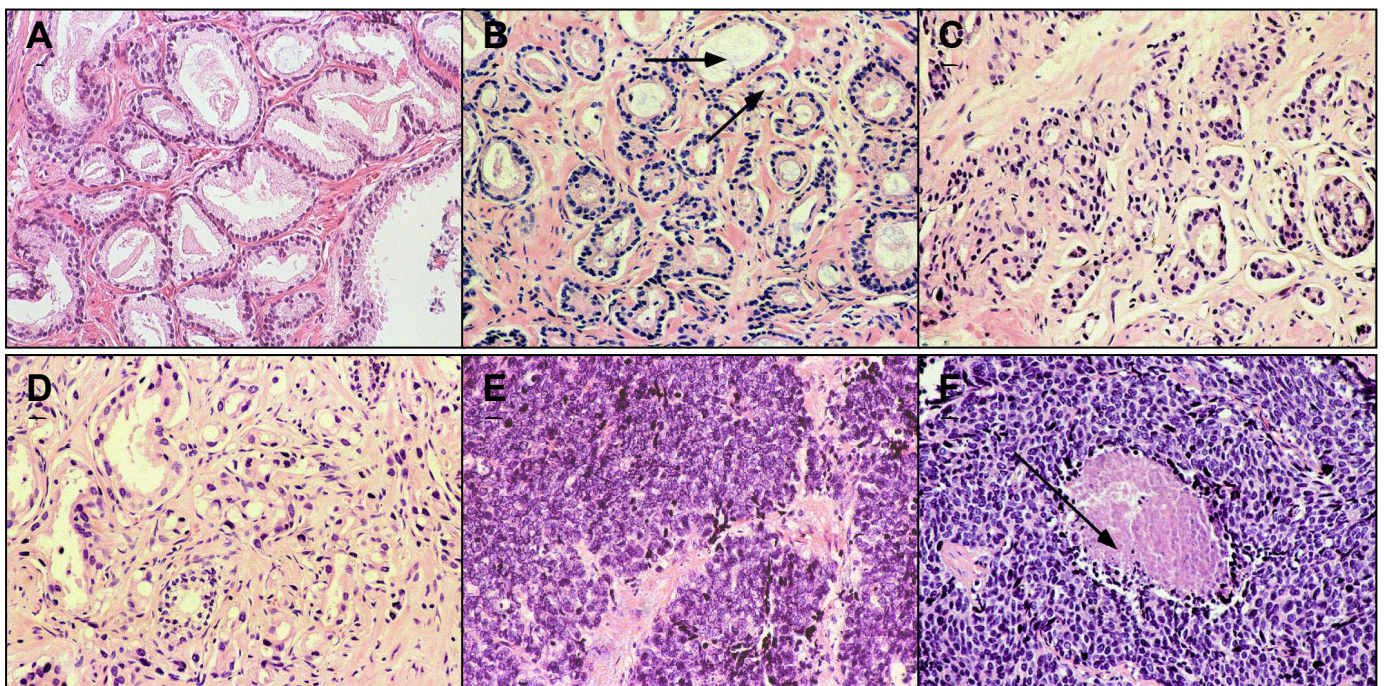
Plusieurs classifications histologiques simples ont été décrites. Cependant la classification de Gleason est la référence utilisée aujourd'hui. **Les grades de Gleason** prennent en compte l'éventail des aspects architecturaux que peut représenter l'adénocarcinome de la prostate,

avec leurs modes d'association et permettent ainsi d'établir un grade histopronostique (Gleason, 1992), (**Figure 2**).

Afin de tenir compte de l'hétérogénéité fréquente du carcinome prostatique, le grade est déterminé pour les deux contingents architecturaux quantitativement prédominants. La somme des deux grades permet d'établir un score, le score de Gleason :

- Un score de 2 à 5 correspond à des formes bien différenciées de carcinome, à pronostic favorable.
- Un score de 6 et 7 aux formes moyennement différenciées, à pronostic intermédiaire.
- Un score de 8 à 10 aux formes peu différenciées, à pronostic défavorable, avec un risque élevé de métastases et de décès lié au cancer.

Figure 2. **A.** grade 2, les glandes sont rondes et ovales avec un lumen apparent. Le diamètre entre les glandes varie très peu. Le stroma n'excède pas la taille des glandes. Les cellules basales sont absentes dans les glandes, caractéristique du cancer. Il existe quelques microglandes dispersées. **B** et **C**, grade 3, les glandes ont des tailles plus variables (flèches noires en B), parfois d'aspect infiltrant, avec une perte partielle du lumen. Les microglandes sont caractéristiques de grade 3. **D.** grade 4, on observe une perte partielle de la différenciation glandulaire comme le démontre la fusion de plusieurs glandes donnant un aspect infiltrant. **E, F** grade 5, perte quasi complète de la différenciation luminale. Les cellules tumorales sont regroupées en amas (des cellules isolées d'aspect invasif peuvent être retrouvées, non montré). **F**, la présence de nécrose, flèche noire, est une caractéristique de grade 5. (D'après le site internet <http://pathology2.jhu.edu/gleason/Links.cfm>).



Ces deux classifications permettent une classification pronostique du CaP, après biopsies ou après prostatectomie totale. D'autres facteurs pathologiques interviennent dans l'établissement du pronostic.

I. 5. 3 Autres facteurs pronostiques pathologiques

A. Volume tumoral

Celui-ci est au mieux apprécié sur la pièce de prostatectomie totale. Les données de la littérature sont contradictoires sur la valeur pronostique de ce volume, notamment en raison de grandes disparités entre les études dans le calcul de ce volume (diamètre maximal, volumétrie assistée par ordinateur) (Chen et al., 2003 ; Stamey et al., 1999 ; Renshaw et al., 1999 ; Carvalhal et al., 2000).

En cas de traitement local par irradiation, ce volume tumoral peut être apprécié sur les données biopsiques. Les critères à prendre en compte sont alors le pourcentage ou le nombre de carottes envahies, la longueur tumorale totale ou maximale par carotte, le pourcentage moyen ou maximal d'envahissement par carotte. Ces critères biopsiques ont clairement été établis comme facteurs pronostiques majeurs avant décision thérapeutique (Ravery et al., 2000).

B. Statut des marges chirurgicales

L'analyse des pièces de prostatectomies totales doit comporter une analyse des marges chirurgicales. La présence de marges chirurgicales positives, définies par la présence de cellules cancéreuses au contact de la marge encrée par le pathologiste, est un facteur majeur prédictif de la récurrence biologique après prostatectomie (Ploussard et al., 2011a).

I.6 Traitement du cancer de la prostate.

Les possibilités de traitement sont nombreuses et dépendent de plusieurs facteurs principalement : le stade de la tumeur (tumeur localement avancée, TNM), son extension éventuelle (métastases osseuses), degré de différenciation (grade de Gleason), l'âge du patient et le taux de PSA.

En cas de CaP localisé à la prostate (sans métastases), le traitement sera dit curatif, basé sur un traitement radical local (prostatectomie, radiothérapie, curiethérapie...) plus ou moins associé à un traitement général hormonal transitoire.

En cas de métastases ganglionnaires, osseuses ou viscérales, le traitement ne peut plus être curatif. Le traitement de ces cancers évolués est depuis les travaux de Huggins en 1941 basé sur la sensibilité du tissu prostatique aux androgènes (Huggins and Hodges, 1972). Le traitement du cancer de la prostate par suppression des androgènes entraîne la mort des cellules hormono-dépendantes. Ceci se reflète notamment par une diminution du volume de la prostate. Depuis cette date, on appelle "traitement hormonal" tout traitement qui vise à diminuer ou à contrecarrer l'effet des androgènes par l'inhibition des propriétés transcriptionnelles de son récepteur. Nous aborderons plus loin les différentes options pour ce type de traitement

I.6.1 Traitement des CaP localisés et localement avancés

A- Pour le traitement des CaP localisés (T1-T2, N0, M0) :

Il existe depuis plusieurs années deux traitements de référence : la **vésiculo-prostatectomie totale** qui consiste à enlever toute la prostate, les vésicules séminales et une partie des canaux déférents ; et la **radiothérapie** externe qui utilise un rayonnement ionisant de haute énergie (60 à 80 Gy) pour détruire les cellules cancéreuses ou ralentir leur prolifération. La zone irradiée comprend très souvent la prostate, les vésicules séminales et éventuellement les aires ganglionnaires pelviennes.

La **curiethérapie** par implants permanents d'iode 125 est aussi une option thérapeutique qui s'adresse à des tumeurs localisées de bas grade à faible risque. Elle est moins utilisée en France qu'aux Etats-Unis. Elle est réservée aux prostates de petit volume, sans troubles urinaires du bas appareil majeurs, et aux CaP de score de Gleason 6, voire 3+4 maximum. La réalisation d'une IRM pré-curiethérapie semble également indispensable afin d'éliminer une tumeur extraprostatique qui contre-indiquerait le curiethérapie.

La **surveillance active** est depuis quelques années une option thérapeutique intéressante en cas de CaP à faible risque. La surveillance active consiste à encadrer le suivi des patients atteints de CaP à faible risque de progression dans le but de leur épargner les conséquences

fonctionnelles d'un traitement curatif, tout en pouvant identifier à temps des signes d'évolutivité de la maladie afin de ne faire subir aucune perte de chance au patient en cas de progression du CaP. La surveillance active est depuis quelques années un traitement validé du CaP à faible risque (Heidenreich et al., 2011). Cependant, les critères initiaux au diagnostic de faible risque évolutif ne sont pas clairement identifiés, et ils varient de façon importante en fonction des centres. Les urologues se basent essentiellement sur les données du toucher rectal (stade T1c, voire T2a), la valeur du PSA (>10 ou 15ng/ml), la densité du PSA (<0.15 ou 0.20 ng/ml/gr) et des critères biopsiques extrêmement variables selon les centres (<3 carottes envahies ou <33% des carottes envahies, <3 mm de cancer par carotte ou <50% de cancer par carotte) (**Tableau 3** ; Klotz et al., 2010 ; van den Bergh et al., 2009 ; Roemeling et al., 2006 ; van As et al., 2008 ; Tosoain et al., 2011 ; Eggener et al., 2009). Cette variabilité souligne l'imperfection de la combinaison de ces critères pour identifier de manière formelle un CaP non significatif. De nombreuses études ont ainsi insisté sur la sous-classification en CaP à faible risque d'environ 20-25% de CaP à risque élevé de progression (Ploussard et al., 2010, Suardi et al., 2009). Les données de l'Hôpital Henri Mondor ont confirmé ces constatations à partir d'une base de recueil prospective. Le risque de sous-estimer sur les critères pré-opératoires un CaP de score de Gleason élevé (>3+4) et/ou dépassant la capsule prostatique a ainsi été estimé à 20-30%, quelque soient les critères d'inclusion retenus (Ploussard et al., 2009). Un protocole prospectif de surveillance active est actuellement ouvert en France, le protocole SURACAP. Les critères d'inclusion ont été restreints, par rapport aux critères publiés par d'autres centres, afin de limiter ce risque de sous-classification d'un CaP à risque élevé. Les CaP envahissant moins de 3 carottes sur moins de 3 mm sont inclus, avec une re-biopsie systématique avant l'inclusion dans le protocole de surveillance (Staerman et al., 2011 ; Xylinas et al., 2011). De nouveaux moyens pronostiques sont donc nécessaires afin de mieux évaluer ce risque de CaP « réellement » significatif. Les améliorations techniques de l'IRM fonctionnelle (coefficient de diffusion, IRM 3 Teslas) pourront probablement améliorer cette prédiction de risque. Les séquences standard d'IRM actuellement disponibles dans la majorité des cabinets de radiologie se sont révélées insuffisantes dans ce cadre précis (van As et al., 2009 ; Umbehr et al., 2009 ; Ploussard et al., 2011c).

Cependant, quelque soient les critères reconnus, les résultats à moyen terme des larges séries prospectives confirment la sécurité carcinologique de l'attitude de surveillance active (Tosoain et al., 2011 ; Klotz et al., 2010 ; van den Bergh et al., 2009).

Tableau 3. Principaux critères d'inclusion dans des protocoles de surveillance décrits dans la littérature : différences selon les centres.

<i>Centre</i>	<i>Patients (%)</i>	<i>Gleason</i>	<i>PSA</i>	<i>PSAD</i>	<i>Toucher rectal</i>	<i>Biopsies positives</i>	<i>% envahissement /carotte</i>
University of Toronto	485 (41.7)	≤ 3+4	≤15	-	T1/T2	≤3	≤50%
Royal Marsden	796 (68.6)	≤ 7	≤20	-	T1/T2	-	-
John Hopkins	191 (16.4)	≤6	-	≤0.15	T1	≤2	≤50%
UCSF	395 (34)	≤6	≤10	-	T1/T2	≤1/3 des Biopsies	≤50%
MSKCC	830 (71.5)	≤7	-	-	T1/T2	-	-
PRIAS	306 (26.3)	≤6	≤10	≤0.2	T1/T2	≤2	-

D'autres options thérapeutiques peuvent également être défendues dans des cas particuliers, comme **la thérapie focale** ou **les traitement ablatifs** (radiofréquence, HIFU, cryothérapie), voire les traitements visant la vascularisation (laser interstitiel).

Après traitement local curatif, globalement, environ un patient sur trois pour un cancer localisé de la prostate aura une récurrence biologique dans les 10 ans se matérialisant par une récurrence biologique, éventuellement clinique, locale ou à distance. Ces taux de récurrences varient selon l'appartenance initiale aux groupes à risque précédemment décrits. En cas de CaP à faible risque, le taux de récurrence à 15 ans est évalué à 10% environ. Il est de plus de 50% en cas de CaP à risque fort de récurrence. Dans certains cas de récurrence locale prouvée (par biopsies et/ou imagerie avec l'apport actuelle du TEP-scan à la choline), un deuxième traitement local peut être proposé, essentiellement par radiothérapie de rattrapage si le patient a subi une chirurgie comme traitement initial. Dans le cas contraire, une castration chirurgicale ou pharmacologique est indiquée.

B- Pour les formes localement avancées (T3-T4, N0-Nx, M0) :

Un traitement par radiothérapie associée à une hormonothérapie à durée longue (> 3ans) est très souvent le standard thérapeutique (Bolla et al., 2010). Une prostatectomie peut être proposée en option, avec la forte probabilité de compléter ce traitement par une radiothérapie et est suivie d'une hormonothérapie en cas d'envahissement ganglionnaire.

I.6.2 Formes métastatiques d'emblée (T1-T4, N1, M0-M1) ou en récurrence et traitement hormonal

La castration, chimique ou chirurgicale, est le traitement standard de première intention.

Dans le cas du cancer de la prostate, les cellules cancéreuses gardent certaines caractéristiques des cellules prostatiques normales et notamment leur hormono-sensibilité. Le traitement hormonal a été initialement basé sur l'orchidectomie bilatérale. La pharmacologie a débuté avec l'utilisation d'un estrogène de synthèse : le Diethylstilbestrol (DES). Ce composé qui a été considéré aux Etats Unis comme la drogue de référence (Denmeade and Isaacs, 2002; Garnick, 1999) n'est plus utilisé en routine comme traitement de première ligne, depuis la démonstration de ses effets cardiovasculaires (Byar and Corle, 1988).

La suppression des androgènes testiculaires est effectuée principalement par l'utilisation d'injection mensuelle ou trimestrielle d'analogue de LH-RH. La sécrétion de LH, qui est synthétisée par l'hypophyse est elle même contrôlée par une neurohormone, la GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*, aussi appelée LHRH). Ainsi, lorsque la concentration de testostérone dans le sang est importante, l'hypothalamus libère une quantité plus faible de GnRH. L'hypophyse distribue alors une quantité diminuée de LH mais également d'une autre hormone la FSH (*follicle stimulating hormone*) agissant sur les cellules de Sertoli en stimulant la sécrétion de l'ABP (*androgen binding protein*) (Hansson et al., 1975). La baisse de la sécrétion de LH réduit ainsi la production de testostérone.

La GnRH joue un rôle important dans la physiopathologie prostatique puisqu'elle contrôle la production de testostérone *via* LH. En se basant sur leur capacité à supprimer l'activité de l'axe hypothalamus-hypophyse-testicules, et donc à réduire la sécrétion de testostérone, les analogues de la GnRH sont couramment utilisés dans le traitement du cancer de prostate. Le développement d'anti-androgènes entrant en compétition avec la

dihydrotestostérone (DHT) au niveau des récepteurs des androgènes intracellulaires est à l'origine de diverses manipulations hormonales. Les anti-androgènes dits purs se définissent comme des composés servant uniquement à bloquer l'action des androgènes sans inhibition de la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires. Les anti-androgènes purs actuellement disponibles sont le flutamide, le nilutamide et le bicalutamide. (Kaisary et al., 1995; Raynaud et al., 1979)

Le développement de cette nouvelle classe de médicament est à l'origine du blocage androgénique dit "complet" (BAC). En effet, l'adjonction d'un traitement anti-androgène pur à la castration chimique ou chirurgicale doit assurer une meilleure privation androgénique, puisqu'elle vise à la fois les androgènes testiculaires mais également les androgènes produits au niveau des cellules cibles à partir des précurseurs surrénaliens.

La privation androgénique par castration chirurgicale ou médicamenteuse conduit donc à une baisse importante de la testostérone plasmatique entraînant l'apoptose des cellules androgéno-dépendantes. Ces traitements entraînent le plus souvent une diminution du volume de la prostate et des métastases. Néanmoins, l'effet du traitement hormonal n'est que palliatif car certaines cellules survivent et progressent sur un mode de croissance androgéno-indépendant.

La phase métastatique comporte ainsi deux périodes successives. Au cours de la période initiale qualifiée d'hormono-dépendante, la privation androgénique permet d'obtenir dans 90 % des cas un contrôle satisfaisant de la maladie qui le plus souvent associera la diminution voir la normalisation du taux de PSA. Quoi qu'il en soit, dans un délai de 12 à 36 mois (Hellerstedt and Pienta, 2002), le cancer évoluera de manière quasi-constante vers le stade de la résistance à la castration caractérisé par la reprise évolutive de la maladie, l'élévation des taux de PSA précédant de plusieurs mois la symptomatologie clinique dans au moins deux tiers des cas. Malgré des résultats encourageant en chimiothérapie, les traitements de deuxième ligne n'améliorent pas ou très peu la survie des patients malgré des efficacités certaines sur la qualité de vie du patient.

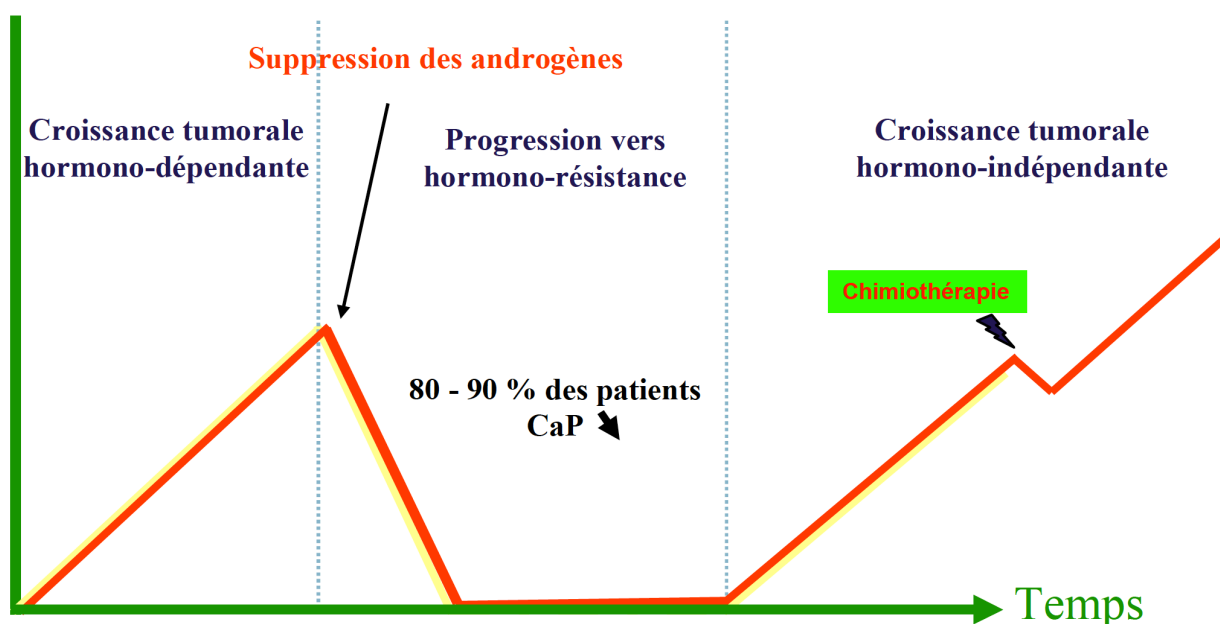


Figure 3. Représentation schématique de la croissance tumorale (phase hormono-dépendante, puis résistance à la castration) et des effets sur cette croissance de la séquence thérapeutique habituelle : maladie sans traitement local ou en récurrence après traitement local.

I.7 Résistance à la castration : mécanismes moléculaires et perspectives thérapeutiques

Différents mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du cancer de la prostate

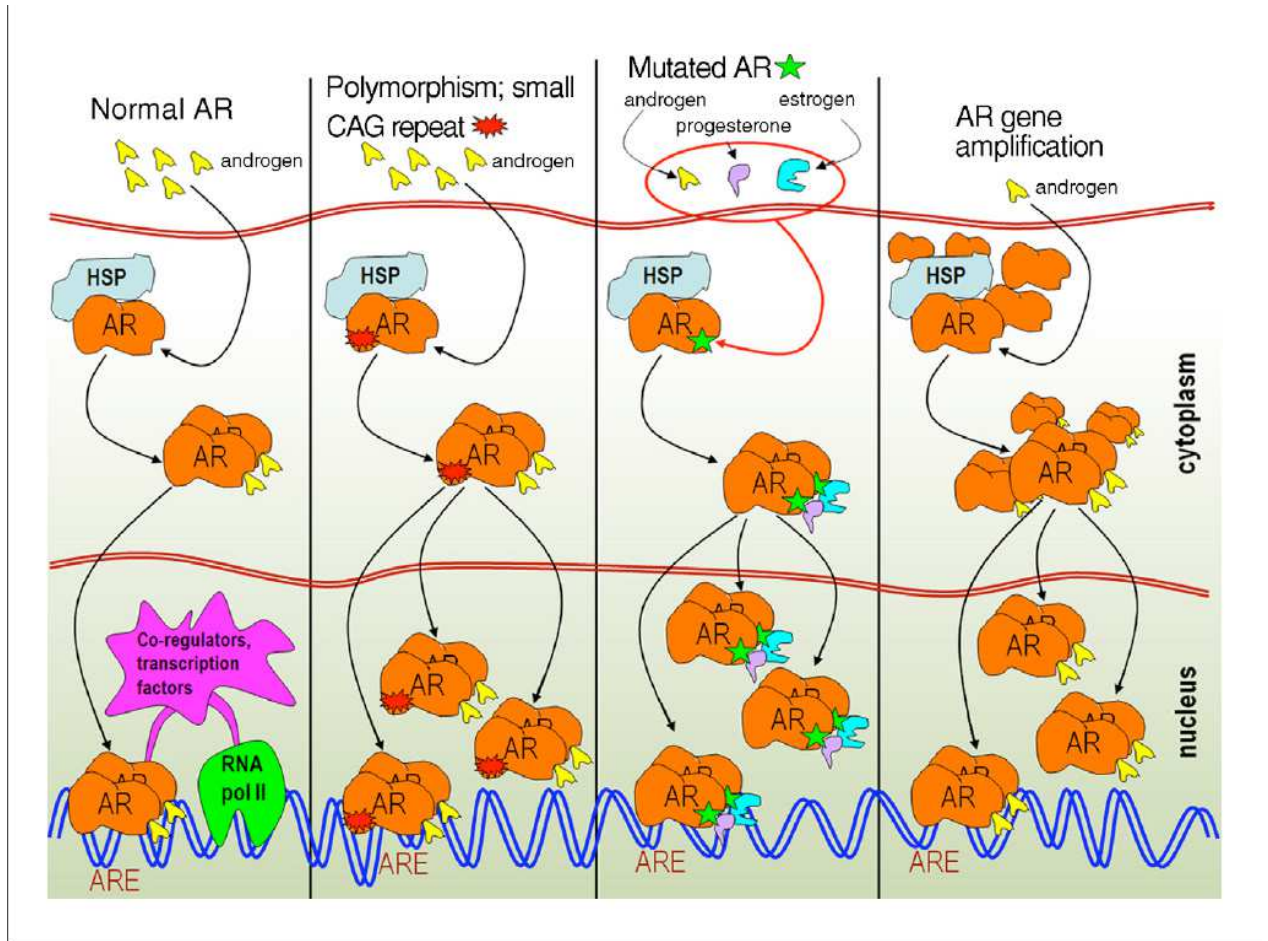
Un problème inhérent au cancer de la prostate est sa grande hétérogénéité rendant difficile l'étude de ces altérations, en particulier lorsque l'histoire naturelle du cancer a été remaniée par les différents traitements. L'instabilité génétique, associée à la pression de sélection exercée par les différents traitements, est responsable en grande partie de cette hétérogénéité cellulaire où coexistent, dans la même tumeur, des clones génétiquement différents. Tout comme le décryptage des voies impliquées dans l'émergence et la progression du cancer avant traitement, le décryptage des voies moléculaires associées à l'acquisition des résistances aux traitements est une étape cruciale dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques prévenant ou contrecarrant ces résistances chez les patients.

I. 7.1. Le récepteur des androgènes

Chez l'homme, la castration n'entraîne pas une régression complète du tissu prostatique. Certaines cellules normales et tumorales sont capables de survivre en l'absence d'androgènes. A partir de ces cellules tumorales, se développe une tumeur résistante à la privation hormonale et à la chimiothérapie. La maladie va alors progresser vers le stade de la résistance à la castration. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement d'un cancer homono-résistant ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant, plusieurs voies moléculaires semblent impliquées. Il est admis que 2 voies moléculaires sont prépondérantes dépendant pour l'une d'entre elle du récepteur des androgènes (RA) (Debes and Tindall, 2004). Les cellules tumorales hormono-résistantes peuvent également utiliser d'autres mécanismes de survie indépendante du RA. La croissance prostatique, tumorale ou non, dépend de la testostérone circulante qui est transloquée dans la cellule puis transformée au niveau de la membrane et du cytosol en DHT, forme plus active. Le DHT est reconnue avec une grande affinité par le récepteur aux androgènes (RA) cytosolique, qui se dimérise et recrute des co-activateurs. Cet ensemble moléculaire agit comme facteur de transcription au niveau nucléaire et active des séquences particulières de l'ADN, les ARE (Androgen Responsible Elements). Cette voie « habituelle » n'est cependant pas la seule voie d'activation du RA.

Le récepteur des androgènes peut également être activé par d'autres voies d'activation, indépendante du ligand et donc des androgènes (**Figure 4**). Le domaine de fixation du ligand du récepteur des androgènes peut également reconnaître des molécules autres que la DHT, notamment d'autres hormones stéroïdiennes. En phase avancée du CaP, ce domaine est le siège de mutations dans plus de 60% des cas, modifiant la liaison ligand-récepteur par modification tridimensionnelle su site de fixation. La cellule tumorale peut donc proliférer en l'absence d'androgènes circulants, dans un milieu androgéno-indépendant. Les modèles *in vitro* de lignées cellulaires androgéno-dépendantes cultivées en milieu strippé sans androgènes ont conforté les observations cliniques de résistance à la castration. On observe notamment une sur-expression du cytochrome CYP17 qui permet, à partir du cholestérol circulant, de transformer ce dernier en androgènes intracellulaires. Il en résulte une augmentation considérable des androgènes intracellulaires provenant d'hormones stéroïdiennes. On peut ainsi retrouver chez des patients castrés chirurgicalement des taux tissulaires de DHT suffisants pour permettre l'activation du RA (Titus et al., 2005b).

Figure 4. Différentes voies d'activation du récepteur des androgènes. (D'après Gellman et al., 2002)



Le récepteur des androgènes est donc impliqué dans la progression vers la résistance à la castration des cellules tumorales (Fizazi et al., 2011). Il a été suggéré comme le point central de l'hormonosensibilité du CaP et la cible privilégiée des thérapies ciblées. Plusieurs mécanismes ont été proposés (Feldman and Feldman, 2001).

(i) l'hypersensibilité des cellules cancéreuses prostatiques aux androgènes.

L'amplification du gène et la surexpression du récepteur des androgènes au stade de l'échappement hormonal ont été mises en évidence par FISH 30% (Visakorpi et al., 1995) et immunohistochimie (van der Kwast et al., 1991). Ceci pourrait compenser un faible taux des androgènes circulants. En effet, il existe une sensibilité accrue du RA pour les androgènes dans

les cellules androgéno-indépendantes par rapport aux cellules dépendantes des androgènes (Gregory et al., 2001b). Dans un modèle de xénogreffe, Chen *et al.* montre que la surexpression du RA confère à ces tumeurs une résistance envers les anti-androgènes (Chen et al., 2004a).

(ii) les mutations du RA :

De très nombreuses mutations affectant le RA ont été identifiées à ce jour. Une data base est d'ailleurs mise à jour chaque mois sur <http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>. L'apparition de mutations du RA est décrite dans 10 à 50 % des cancers de prostate (Heinlein and Chang, 2004; Taplin et al., 1999; Wallen et al., 1999). De manière intéressante, le taux de mutation du RA est faible dans le CaP localisé à la différence des CaP avancés et hormono-résistants, dans lesquels la fréquence semble largement augmentée suggérant un rôle important de ces mutations dans l'échappement à la privation androgénique (Marcelli et al., 2000). L'émergence de ces mutations résulterait de la sélection de clones mutés trouvant dans leur environnement un ligand endogène ou exogène, présent à des taux suffisants pour soutenir leur survie et leur prolifération. D'un point de vue fonctionnel, certaines mutations sensibiliseraient le RA aux glucocorticoïdes, aux hormones stéroïdiennes (progestérone, œstradiol, déhydropiandostérone et androstènedione) et également à certains anti-androgènes tels que le flutamide utilisé dans les traitements hormonaux (Chang et al., 2001; Veldscholte et al., 1992). Le prototype de ces mutations est celle qui est présente dans la lignée androgéno-sensible LNCaP. Le RA porte une mutation sur le codon 877 changeant une thréonine en alanine au niveau du site de liaison au ligand. Rencontrée chez 20% des patients en échappement au flutamide, elle rend le récepteur stimuable par son métabolite actif l'hydroxy-flutamide. L'émergence de ce mutant explique l'observation de cas de rémissions transitoires de la maladie lorsque les patients en échappement hormonal sont sevrés de flutamide (Paul and Breul, 2000). Il est également bien connu que le récepteur porteur de la mutation L701H, retrouvé chez des patients en échappement hormonal, est stimulé par les glucocorticoïdes, au même titre que le double mutant L701H/T 877A (Zhao et al., 1999). Toutefois, les propriétés fonctionnelles des mutants ont surtout été testées à l'aide de modèles *in vitro* et les propriétés fonctionnelles peuvent être éminemment affectées par d'autres modifications génétiques et épigénétiques ayant lieu au cours de la progression tumorale. Enfin, il faut souligner que parmi les mutations détectées chez les patients, un grand nombre n'ont pas encore de rôle fonctionnel connu, d'autres encore seraient inactivatrices. Celles-ci sont généralement localisées dans la région codant le domaine

de liaison à l'ADN. L'existence de telles mutations, suggèrent que la voie du RA classique ne serait pas toujours indispensable à la progression tumorale (Nazareth et al., 1999; Shi et al., 2002).

(iii) l'implication des co-activateurs :

Les protéines co-régulatrices sont définies comme des protéines qui interagissent avec les récepteurs nucléaires pour augmenter (co-activateurs) ou diminuer (co-répresseurs) la transactivation du récepteur sans altérer son expression basale. Plusieurs travaux évoquent la surexpression de certains co-activateurs au cours de la progression tumorale et dans certains échantillons de tumeurs prostatiques hormono-résistantes (Agoulnik et al., 2006; Gregory et al., 2001a). Ainsi les co-activateurs ARA-70 (Yeh and Chang, 1996) et ARA-55 sont surexprimés dans les cancers hormono-résistants comparé aux cancers hormono-sensibles (Fujimoto et al., 2001). L'ensemble de ces travaux suggère donc un rôle important des co-activateurs du RA dans la progression vers l'androgéno-indépendance.

(iv) l'activation du récepteur des androgènes indépendante du ligand :

Le RA est potentiellement activable en l'absence d'hormone par certains facteurs de croissance (IGF-1, KGF, EGF) (Culig et al., 1994). Cette activation se fait par phosphorylation. Beaucoup plus documenté dans le cancer du sein, le rôle du récepteur HER-2/neu dans le cancer prostatique est controversé. L'expression de HER-2/neu est directement régulée par le RA (Berger et al., 2006). Le cas de l'IL-6 paraît également intéressant dans le sens où son taux sérique est élevé chez les patients échappant au traitement hormonal (Drachenberg et al., 1999). En réalité, le taux d'IL-6 semble augmenter dès les stades localisés de la maladie et se présente alors comme un facteur de mauvais pronostic du cancer de la prostate (Nakashima et al., 2000). Dans les cellules LNCaP, Ueda et al ont démontré que l'IL-6 augmente la phosphorylation des MAPK qui activent par phosphorylation le domaine N-terminal du RA indépendamment de la fixation du ligand (Ueda et al., 2002). Certains auteurs observent un effet opposé à celui décrit précédemment, c'est à dire une co-répression de l'IL-6 sur le RA (Jia et al., 2004). Ces données contradictoires révèlent toute la complexité des mécanismes impliquant l'IL-6 et sont probablement liées à la possibilité pour IL-6 d'induire une transdifférenciation neuroendocrine des cellules prostatiques (Paule et al., 2007; Wang et al., 2004b).

Plusieurs autres mécanismes de progression vers la résistance à la castration sont exposés ci-après (*Figure 5*).

I. 7. 2 TP53

TP53 est un gène suppresseur de tumeur qui coordonne plusieurs points de contrôle du cycle cellulaire, l'entrée en sénescence, la réparation de l'ADN ou encore l'induction de l'apoptose (Ko and Prives, 1996). De manière particulièrement intéressante, des travaux antérieurs, réalisés sur des modèles murins et de xénogreffes humaines ont montré que la perte du gène TP53 était favorable à la croissance androgéno-indépendante des cellules prostatiques après castration (Burchardt et al., 2001; Colombel et al., 1995). Cependant chez les patients atteints de cancers de la prostate, le rôle et la valeur pronostic de telles altérations sont discutés (Brooks et al., 1996; McDonnell et al., 1997).

I. 7. 3 Bcl2

L'oncogène bcl-2 : Son activité oncogénique a été découverte après identification d'une translocation t(14,18) retrouvée dans les lymphomes folliculaires de type B. Cette translocation induit la surexpression de Bcl-2 (Tsujimoto et al., 1984). Bcl-2 joue un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose notamment en contrôlant l'intégrité de la membrane mitochondriale. Bcl-2 semble fréquemment détecté dans les cancers de la prostate hormono-résistants, ce qui n'est pas le cas dans les cancers hormono-naïfs (Colombel et al., 1993; McDonnell et al., 1992). Une surexpression de Bcl-2 est associée à une croissance androgéno-indépendante (Raffo et al., 1995). De plus, son expression est réprimée par les androgènes (Huang et al., 2004). Utilisant un oligonucléotide anti-sens (G3139), l'équipe du professeur Gleave à Vancouver a pu mettre en évidence l'efficacité d'un ciblage de Bcl-2 pour ralentir la progression vers l'hormono-résistance (Gleave et al., 1999; Miyake et al., 1999). En outre, cet anti-sens, maintenant développé par Genta (Genasense®) rendrait les tumeurs prostatiques sensibles au taxol. Cette observation illustre que des gènes impliqués dans l'émergence de clones androgéno-résistants peuvent avoir un rôle dans la chimiorésistance du cancer de la prostate (Gleave et al., 1999; Leung et al., 2001).

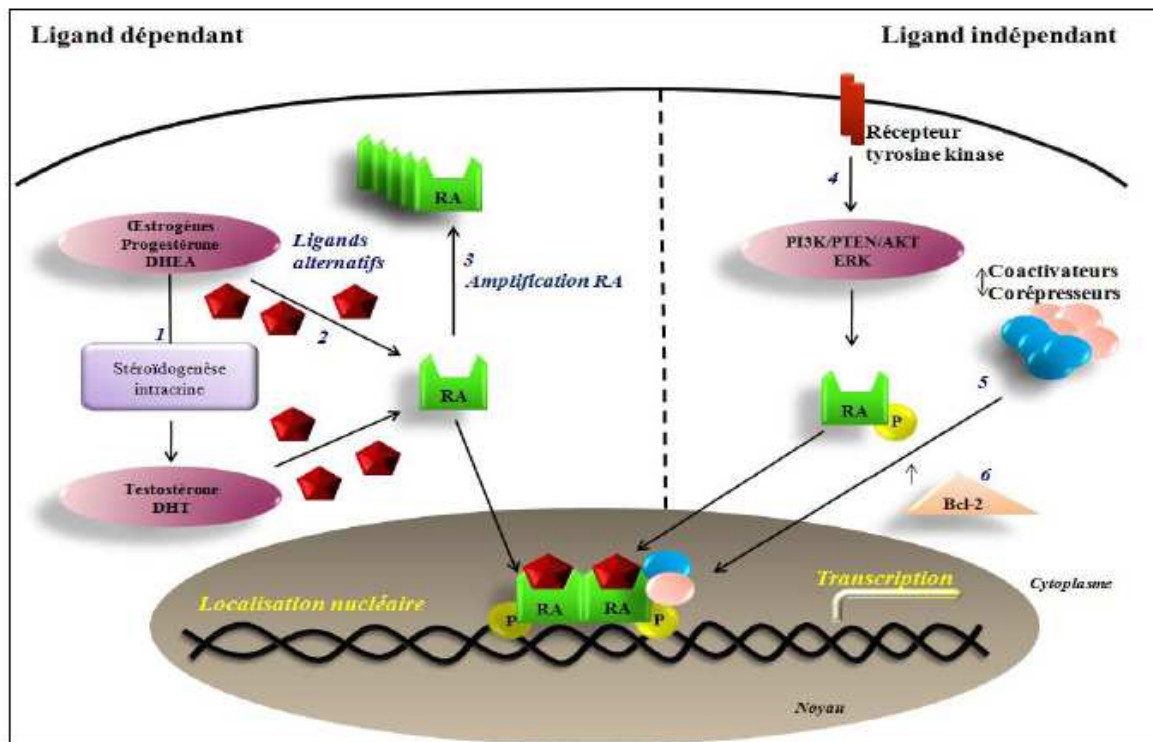
I. 7. 4 Différenciation neuroendocrine :

Une des hypothèses de l'échec du traitement hormonal est que certaines tumeurs proviendraient de la sélection d'une cellule androgéno-indépendante qui échapperait à la privation androgénique. Au cours de ces dernières années, plusieurs études impliquent le rôle des cellules neuroendocrines (NE) dans la progression du cancer de la prostate vers le stade de l'échappement hormonal (Cussenot et al., 1998 ; Hirano et al., 2004; Ito et al., 2001 ; Jiborn et al., 1998). Ces cellules se caractérisent par l'expression de marqueurs tels que la chromogranine-A (CgA), la NSE (*neuron specific enolase*), la synaptophysine. Des taux sériques élevés de Chromogranin-A peuvent précéder de plusieurs mois la remontée du PSA chez les patients échappant au traitement hormonal (Wu et al., 1999). Les populations émergentes de cellules cancéreuses NE-like expriment plusieurs facteurs, conduisant à une sécrétion importante de neuropeptides bioactifs qui agiraient de manière autocrine, ou paracrine pour stimuler la croissance ou la survie des cellules cancéreuses avoisinantes. De façon intéressante, certains neuropeptides pourraient activer la voie du RA (Dai et al., 2002; Lee et al., 2001; Jin et al., 2004). Des expériences suggèrent en outre que ces facteurs peuvent agir à distance pour promouvoir la dissémination métastatique des tumeurs prostatiques et soutenir leur croissance androgéno-indépendante (Deeble et al., 2007; Jin et al., 2004); Jongasma et al., 1999; Uchida et al., 2006). Les mécanismes gouvernant une telle « transdifférenciation neuroendocrine » sont très mal connus. Une revue récente tente de faire le point sur les mécanismes potentiellement impliqués (Yuan et al., 2007). De manière intéressante, *in vivo*, des cellules cancéreuses à phénotype intermédiaire « NE » et « épithéliales » (positives pour PSA) sont parfois retrouvées (Cohen et al., 1992) et *in vitro*, il a été observé que les cellules tumorales prostatiques peuvent acquérir un phénotype neuroendocrine pure (non réversible) (Yuan et al., 2006) ou intermédiaire (réversible) soulignant une plasticité de ces cellules pour s'adapter à leur environnement (Cox et al., 1999). De nombreux modèles *in vivo* et *in vitro* tendent ainsi à valider cette hypothèse de la transdifférenciation (de Pinieux et al., 2001b; Huss et al., 2007; Huss et al., 2004b; Rocchi et al., 2004; Wright et al., 2003; Yuan et al., 2007). Pourtant, très peu d'études démontrent réellement la pertinence d'une transdifférenciation neuroendocrine chez les patients atteints d'un cancer de la prostate. Un autre fait intéressant est que des cellules prostatiques cancéreuses NE-like ont été retrouvées dans les métastases, preuve supplémentaire du caractère malin de ces cellules (Chevalier et al., 2002; Pouessel et al., 2007).

Nous verrons au cours de cette thèse l'intérêt de l'étude de la β -tubuline de classe III (β III-tubuline), dont l'expression est augmentée en cours de traitement hormonal et qui sera étudiée dans des expériences ultérieures en tant que marqueur de différenciation neuro-endocrine.

Figure 5. Récapitulatif des voies de progression vers l'hormono-résistance.

1. La stéroïdogénèse intratumorale contribue à la synthèse de testostérone et de DHT et pourrait contribuer à la persistance d'androgènes malgré la castration.
2. Des mutations du RA diminuent la spécificité du récepteur pour d'autres stéroïdes et augmentent son affinité pour les androgènes résiduels.
3. L'amplification augmente l'expression du RA qui est, dès lors, plus sensible aux faibles concentrations d'androgènes.
4. Activation du RA en l'absence d'androgènes par l'activation d'autres voies de signalisation dont celle des récepteurs tyrosine kinase phosphorylant le RA ou ses co-activateurs.
5. Le changement dans la balance des co-activateurs/répresseurs du RA augmente son affinité.
6. D'autres voies de signalisation fonctionnent indépendamment du RA (sur-expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2).



Le consensus actuel, est donc que l'activation de la voie RA reste déterminante dans la progression tumorale vers l'échappement hormonal (**Figure 5**). Il convient toutefois de considérer que les mécanismes moléculaires de l'échappement hormonal des cancers de la prostate sont complexes et multifactoriels. En outre, l'étude *in vitro* de ces phénomènes dépend fortement des modèles et des conditions utilisées qui varient parfois de manière surprenante entre les auteurs.

I.8 Prise en charge de la maladie résistante à la castration : modifications hormonales, chimiothérapie par docétaxel et drogues émergentes

I.8.1 Modifications hormonales : Lesquelles ? Jusqu'à quand ?

La modification de l'hormonothérapie a été largement étudiée dans la littérature, avant l'avènement de la chimiothérapie par taxanes. Les facteurs prédictifs de réponse aux manipulations hormonales ont été établis par Scher en 1999 (Scher et al., 1999). La diminution du PSA de plus de moitié à 3 mois était un facteur de réussite de ces modifications hormonales. D'autres facteurs ont depuis été identifiés : le temps de doublement du PSA, les critères RECIST de réponse sur l'imagerie de suivi et les cellules tumorales circulantes. Quelles modifications hormonales peuvent être réalisées ?

L'orchidectomie n'apporte rien à ce stade, si la castration a préalablement été vérifiée par un dosage de testostéronémie. Le retrait de l'anti-androgène peut bénéficier au patient sur quelques mois dans seulement 20% des cas avec une durée de réponse de 3-5 mois, et quelque soit l'anti-androgène. Le changement d'agoniste semble également efficace transitoirement chez certains patients. L'efficacité a récemment été objectivée chez 69% des patients pour une durée de réponse de 5 mois environ, et essentiellement dans le sens leuproréline vers goséréline (Lawrentschuk et al., 2011). Le bénéfice du remplacement de l'analogue par un antagoniste de la LH-RH reste discuté. L'étude CS21a de Crawford présenté à l'AUA 2011 a souligné l'intérêt de ce switch chez les patients traités par leuproréline. Les patients inclus dans cette étude n'étaient cependant pas tous résistants à la castration, et les données doivent être confirmées. Les oestrogènes à petite dose ont montré des réponses objectives de l'ordre de 40% en deuxième ou troisième ligne de traitement. Le kétoconazole, antifongique, a des taux de réponses variant entre 20 et 60% selon les études.

Les recommandations européennes statuent sur ces modifications hormonales par des grades B et C uniquement. Il est recommandé d'arrêter l'anti-androgène en cas de progression biologique (grade B), mais aucune recommandation claire n'a pu être établie pour d'autres modifications en raison de l'absence d'études randomisées.

Ces modifications hormonales sont donc envisageables, et permettent d'obtenir de façon aléatoire et transitoire une réponse biologique sur le taux de PSA, mais pas d'amélioration en termes de survie spécifique ou globale. Elles sont à essayer plutôt en cas de maladie prostatique à longue durée d'hormonosensibilité, ce qui n'est pas le cas dans le dossier clinique présenté.

I.8.2 Chimiothérapie : Laquelle ? Quand débiter ?

Pour ce qui est du cancer de la prostate, ce type de traitement est actuellement réservé aux cancers résistants à la castration puisqu'à l'heure actuelle, aucune étude n'a réellement démontré un bénéfice clair lorsque la chimiothérapie est administrée à un stade plus précoce de la maladie (Gleave and Kelly, 2005). Contrairement aux cellules cancéreuses métastatiques, le taux de prolifération des cellules cancéreuses dans le cancer localisé est faible (Berges et al., 1995a). Chez les patients ayant des cancers localisés, on s'attendrait donc à obtenir un effet uniquement chez les patients ayant des métastases (ou micrométastases) non détectées au diagnostic. La limite de l'utilisation de ces agents est également liée à leur toxicité. Certains essais de phase III ont évalués l'efficacité des taxanes en situation adjuvante (Cetnar et al., 2008 ; Montgomery et al., 2008 ; Kibel et al., 2007). Un essai a notamment été conduit à l'hôpital Henri Mondor. Les résultats en terme de tolérance ont été publiés ne révélant pas de toxicité majeure quant à l'utilisation d'une chimiothérapie adjuvante par paclitaxel, en dehors d'un délai de retour à la continence un peu plus élevé (Ploussard et al., 2010a). Les données de suivi oncologique à long terme font actuellement défaut.

A. Chimiothérapie de première ligne : le docétaxel

Jusqu'au milieu des années 90, la chimiothérapie avait une place limitée dans le traitement du CaP au stade de l'échappement hormonal. Les essais cliniques s'étaient soldés par des échecs (toxicité importante/efficacité limitée). La démonstration d'une amélioration de la qualité de vie et d'une certaine efficacité pour diminuer le taux du PSA par l'association de mitoxantrone et d'une corticothérapie chez des patients atteints de métastases osseuses avait permis de faire de ce schéma, une référence aux Etats Unis et en Europe sans toutefois prolonger la survie des patients (Kantoff et al., 1999; Tannock et al., 1996). Depuis 2004, l'utilisation des taxanes et du docétaxel en particulier a fait évoluer le traitement du cancer résistant à la castration (Petrylak et al., 2004; Tannock et al., 2004). Concernant le docétaxel, l'analogue semi-synthétique du Taxol, les études **TAX 327** (Tannock et al., 2004) et **SWOG 99-16** (Petrylak et al., 2004), ont montré que le schéma prednisone/docetaxel avec le docetaxel administré toutes les 3 semaines était plus efficace que le schéma à base de mitoxantrone en terme de survie globale. Au total, le docétaxel s'impose aujourd'hui comme le standard du traitement de première ligne du CaP résistant à la castration, permettant une amélioration de la survie globale, à la dose de 75 mg/m² tous les 21 jours (6 à 10 cycles). Le choix du traitement et d'une chimiothérapie précoce lors de la résistance à la castration doit dépendre de l'évolutivité de la maladie métastatique. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte, notamment la durée de l'hormono-sensibilité, le type de métastases (osseuses versus

viscérales), l'importance de l'extension métastatique, et le profil d'évolution du PSA (temps de doublement), afin d'individualiser les approches thérapeutiques. Le séquentiel thérapeutique de la maladie prostatique métastatique résistante à la castration est actuellement standardisé (Guidelines EAU). L'absence de douleur, de métastases viscérales, un âge >68 ans, un performance status >90% en un PSA élevé, ont été associés à une meilleure réponse au docétaxel. Le temps de doublement du PSA est également un facteur important, linéaire, prédictif de la survie globale parmi les patients sous chimiothérapie comparativement à la mitoxantrone (Bertohld et al., 2008). Des nomogrammes sont maintenant disponibles pour prédire cette sensibilité à la chimiothérapie. La chimiothérapie par docétaxel est à mettre en route sans attendre chez les patients symptomatiques. En l'absence de symptômes, le clinicien doit tenir compte du temps de doublement, du taux de PSA, de la présence d'une anémie et de métastases viscérales. Elle est conduite en monothérapie pendant 6 cycles en moyenne en Europe (plutôt 10 cycles aux Etats-Unis) et ne doit pas être poursuivie au-delà de 10 cycles (données ASCO 2011). Un tel traitement court permet de préserver la moelle osseuse en vue d'une seconde ligne éventuelle, d'éviter les toxicités cumulatives, et de re-proposer du docétaxel en cas de progression (« rechallenge »). Ce « rechallenge » reste cependant d'une efficacité limitée, à réserver aux patients bons répondeurs lors de la première ligne de docétaxel avec un intervalle libre long sans chimiothérapie, et est considéré plus comme une prolongation de la première ligne thérapeutique. Actuellement, en première ligne et en dehors d'essais cliniques, le docétaxel doit donc toujours être prescrit en monothérapie.

En cas d'échec, le traitement de deuxième ligne standard est le cabazitaxel, à la dose de 25 mg/m² (deBono et al, 2010). Cependant, de nouvelles molécules arrivent sur le marché, et la prise en charge du CaP résistant à la castration évolue très rapidement. Le sipuleucel-T est évalué en situation pré-docétaxel. En deuxième ligne, les drogues les plus prometteuses, hormis le cabazitaxel, soulignent l'intérêt du blocage du récepteur aux androgènes : abiratérone et MDV-3100. Des études de phase III de ces molécules en situation pré-docétaxel sont attendues, afin de retarder le recours à la première ligne de chimiothérapie.

B. Nouvelles perspectives

Cabazitaxel

Le cabazitaxel est un taxane de nouvelle génération qui favorise la formation des microtubules tout en inhibant leur dépolymérisation, stabilisant ainsi les microtubules et réduisant la dynamique intracellulaire. Le cabazitaxel inhibe *in vitro* la croissance cellulaire

des lignées devenues insensibles au paclitaxel et au docétaxel. L'étude d'enregistrement TROPIC présentée à l'ASCO GU en 2010 (deBono et al, 2010) randomisant cabazitaxel (25 mg/m², 10 cycles) versus mitoxantrone a rapporté une amélioration significative de la survie globale parmi les patients traités par cabazitaxel : 15.1 mois versus 12.7 mois, correspondant à une réduction relative de 30% du risque de décès. En termes de toxicité, le cabazitaxel augmentait significativement le risque de neutropénie de grade 3-4 (82% versus 58%) et de neutropénie fébrile (évalué à 8%). Une prophylaxie primaire par G-CSF semble indispensable dès que les patients sont âgés de plus de 65 ans, ont un mauvais performance status ou des comorbidités significatives. Le second effet secondaire majeur était la présence de diarrhées sévères, de grade 3-4, parmi 6% des patients (versus <1% dans le bras mitoxantrone). La prévention de cette complication par une bonne hydratation et la prescription d'anti-diarrhéiques sont donc importantes, ainsi que l'éducation du patient. Tous les autres effets indésirables étaient relativement comparables entre les deux bras de traitement.

En résumé, le cabazitaxel est un traitement de seconde ligne après chimiothérapie par docétaxel, ayant démontré une amélioration de la survie globale et de la survie sans progression, comparativement à la mitoxantrone, au prix d'une tolérance tout à fait acceptable si les effets secondaires sont correctement pris en charge.

Acétate d'abiratéronne

Les mécanismes intracellulaires de la résistance à la castration génèrent une sur-expression des récepteurs aux androgènes à la surface cellulaire, une augmentation des enzymes intracellulaires de la biosynthèse des androgènes, et paradoxalement une augmentation de la concentration des androgènes intra-tumoraux (Attard et al., 2009 ; *Figure 6*). Cette augmentation de l'activité enzymatique concerne notamment le CYP17A1, qui joue un rôle majeur dans la cascade de formation des androgènes et de la DHT. L'abiratéronne, en prise orale, agit sur le blocage du CYP17 agissant ainsi comme un inhibiteur sélectif de la synthèse des androgènes testiculaires et surrénaliens, mais également en intracellulaire, au sein même de la cellule tumorale. L'étude de phase III COU-AA-301 a randomisé en deux bras placebo versus acétate d'abiratéronne 1000 mg/jour, associés à de la prednisone 10 mg/j (deBono et al., 2011). La survie globale était le critère d'étude principal. L'amélioration de cette survie par l'abiratéronne était significative avec une augmentation de la survie relative de 36%. La médiane de survie était augmentée de 4 mois environ, à 14.8 mois. Ce gain était retrouvé quelque soient les sous-groupes cliniques et pronostiques. Tous les critères secondaires (réponse PSA, survie sans progression) étaient atteints. En termes d'effets secondaires, l'effet

minéralocorticoïde de l'abiratéron expliquait l'adjonction systématique de prednisone afin de limiter les risques d'hypertension artérielle, d'hypokaliémie et de rétention hydrosodée. Le reste du profil de toxicité était favorable comparativement au placebo.

En résumé, l'acétate d'abiratéron augmente la survie globale et la survie sans progression, chez les patients en échec de traitement de première ligne par docétaxel, au prix d'une toxicité faible et d'une galénique intéressante (traitement oral). Il vient d'obtenir l'AMM en France en cas de ré-ascension du PSA en post-docétaxel. Il semble important de noter que l'étude de phase III comparait l'abiratéron au placebo, et non à la mitoxantrone comme dans l'étude TROPIC.

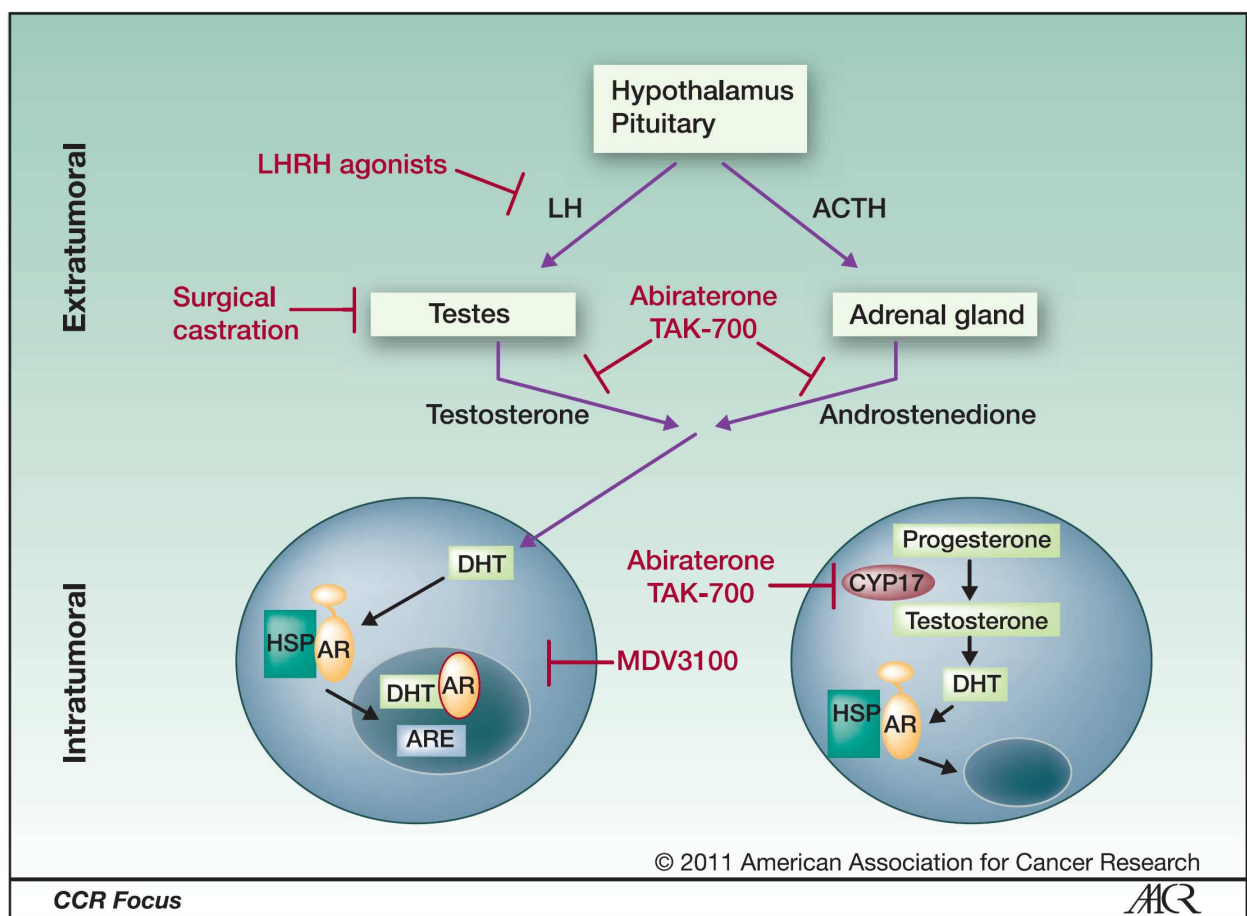


Figure 6. Mécanismes d'action des traitements hormonaux anciens (agonistes de la LR-RH, castration chirurgicale) et nouveaux (abiratéron, MDV-3100, TAK-700), qui se distinguent par leur action sur la stéroïdogénèse à la fois extra-tumorale et intra-tumorale. (D'après Massard et al., 2011)

MDV-3100

Le MDV-3100 cible le récepteur des androgènes, l'antagonise sans effet agoniste, prévenant ainsi la translocation nucléaire du complexe androgène-récepteur, avec une action maintenue en cas de traitement préalable par anti-androgènes par un mécanisme différent et plus affin (**Figure 6**). Sa galénique est favorable, en une seule prise orale par jour, avec un profil de tolérance intéressant hormis une asthénie (Scher et al., 2010). Les taux de réponse biologique (diminution PSA de moitié) étaient très importants dans l'étude de Scher et al., de l'ordre de 50-60%, que les patients soient naïfs ou non d'une chimiothérapie par docétaxel. Les données de corrélation entre ces réponses PSA favorables et les réponses cliniques attendues seront apportées par les études de phase III actuellement ouvertes. Les résultats de l'étude AFFIRM d'enregistrement sont attendus début 2012. Cette étude inclut les patients résistants à la castration en post-docétaxel, et randomise MDV-3100 240 mg/j versus placebo, avec comme critère de jugement principal la survie globale.

Autres agents en cours d'évaluation

D'autres nouveaux agents thérapeutiques sont actuellement en cours d'évaluation dans des études de phase II ou III, en situation pré-docétaxel ou post-docétaxel. La **Figure 7** résume les différents niveaux d'action de ces agents (agents cytotoxiques, vaccination, agents hormonaux, anti-angiogéniques).

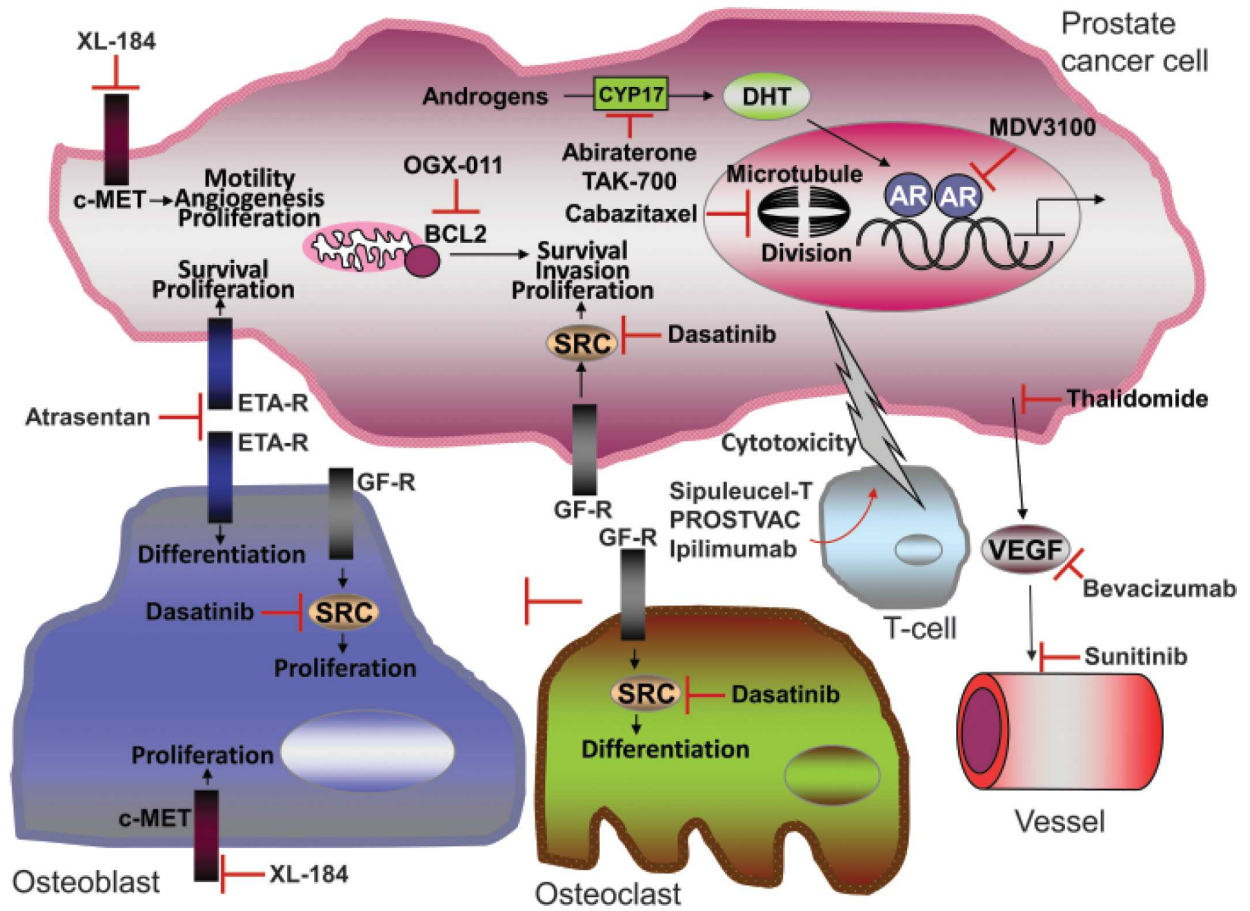



Figure 7. Différents niveaux d'action cellulaires des nouveaux agents thérapeutiques en cours d'évaluation dans la prise de la maladie prostatiques résistante à la castration. (D'après Dayyani et al., 2011)

II. Biomarqueurs pronostiques dans le cancer de prostate

Un biomarqueur peut être défini comme un test moléculaire apportant une information pertinente et nouvelle comparativement aux données cliniques (“ *better, easier, faster and cheaper* ”). Dans le cadre du CaP, un biomarqueur peut apporter cet impact dans les quatre situations schématiques suivantes :

- améliorer le dépistage et le diagnostic du CaP, en précisant les indications de biopsies prostatiques ;
- améliorer la prédiction des CaP agressifs versus non significatifs à partir de données avant traitement, afin de mieux adapter la prise en charge initiale (traitement radical versus surveillance active) ;
- améliorer la prédiction du risque de récurrence après traitement local, afin de discuter de la mise en route de thérapies adjuvantes ou d’un suivi plus contrôlé ;
- améliorer la prédiction de la sensibilité des CaP aux traitements médicaux, hormonaux ou cytotoxiques, afin d’individualiser la prise en charge thérapeutique des stades avancés : valeur prédictive.

Une recherche PubMed combinant « biomarker » et « prostate cancer » retrouve 20 488 publications dont plus de la moitié au cours des 10 dernières années. Une pléthore de nouveaux marqueurs a donc émergé au cours de la dernière décennie. Cependant, à l’heure actuelle, seul le PSA total est utilisé en pratique clinique par la totalité des urologues. Il existe donc un fossé immense entre découverte de nouveau biomarqueur potentiel et validation clinique. De multiples facteurs sont en cause (cohortes hétérogènes, propriété intellectuelle, coûts, reproductibilité...). Devant ce manque de standardisation, en 2002, le National Cancer Institute américain a publié des recommandations, rapprochant la découverte des biomarqueurs du développement d’un médicament, identifiant cinq étapes successives jusqu’à l’utilisation en pratique clinique d’un nouveau biomarqueur.



Phase	Goals/aims	Experimentation	Sample details
Preclinical Testing	Exploratory; nominate and rank candidate biomarker profiles	Preclinical study for hypothesis generation	Possible bias: small size and convenience sampling
0	Develop an assay with clinically reproducible results	Reproducibility and robustness of assay; No assessment of benefit	
I	Test on small sample to determine benefit	Marker optimization, establish prediction rules, determine cut-offs	Sample population assay developed from candidate biomarker profile
II	Determine operating characteristics & internal validation	Retrospective design be the target population	Sample population should be the target population
III	External validation	Retrospective or prospective, Generalizability, Impact on clinical decision-making	Multi-institutional, large study
IV	Assess whether biomarker reduces the burden of disease	Post-approval reporting and testing for other disease processes or disease stages	

Figure 8. Recommandations du National Cancer Institute américain identifiant cinq étapes successives jusqu'à l'utilisation en pratique clinique d'un nouveau biomarqueur.

En 2005, le Comité Statistique du groupe de travail NCI-EORTC a également publié le cahier des charges nécessaires à la publication d'articles rapportant l'impact de biomarqueurs du cancer, par l'intermédiaire du document REMARK (*"Reporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies"*) (McShane et al., 2005). Depuis cette date, le nombre de publications sur la découverte de nouveaux biomarqueurs a sensiblement diminué.

Une revue récente de la littérature a ainsi souligné la piètre qualité et la grande hétérogénéité des études de biomarqueurs dans le CaP (Sutcliffe et al., 2009). Beaucoup de séries incluaient des patients ayant un suivi de moins de 5 ans, avec comme critère principal la survie sans récurrence et non la survie globale. Au total, seulement 30 études ont été jugées méthodologiquement fiables et les auteurs renaient uniquement la vélocité du PSA comme nouveau biomarqueur fiable, comparativement au PSA total !

II.1 Un marqueur biologique de référence : le PSA

II.1.1 Le PSA

De tous les marqueurs biologiques du cancer de la prostate, le PSA (*prostate specific antigen*) est largement le plus utilisé. Il est souvent à la base du diagnostic de cancer de la prostate.

Le gène hKLLK3, qui code le PSA est localisé sur le chromosome 19q13.4. La transcription du gène est régulée positivement par le RA. Son expression reflète donc l'activité du RA. Fonctionnellement, le PSA est une enzyme appartenant à la famille des kallikréines et présentant une activité de type trypsine. Son rôle est associé à la liquéfaction du sperme qui est déterminante pour la vitalité des spermatozoïdes. Sa demi-vie est de 2,2 jours. Une partie de cette sécrétion va passer dans le sang. Le PSA sérique se présente sous deux fractions:

- Une partie correspondante à la forme libre qui résulte du clivage par les enzymes tissulaires (ou PSA-libre). Cette forme représente 10 à 40 % du PSA sérique total. Elle ne possède pas d'activité enzymatique et ne peut se lier aux inhibiteurs protéasiques.
- Une partie correspondante à une forme complexée avec des inhibiteurs de protéases comme l' α 1 antichymotrypsine (60 à 90% du PSA sérique total), l' α 2 macroglobuline, l'inhibiteur de protéase α 1 (moins de 0,1% du PSA sérique total).

L'élévation du PSA dans le sang témoigne d'une pathologie prostatique sous-jacente comme l'HBP, le cancer de la prostate, ou encore la prostatite. Chez l'homme de 50 à 75 ans, toute augmentation du PSA supérieure à 4 ng/mL doit conduire le praticien à proposer des biopsies prostatiques. Un taux de 3 ng/mL peut servir de référence à partir de 45 ans chez les patients ayant un risque familial de cancer de la prostate et chez les patients d'origine afro-antillaise (Salomon et al., 2010). Sa première fonction est donc **diagnostique**. Les limites de l'utilisation du PSA comme outil de dépistage, sont cependant fréquemment soulignées. Ainsi, parmi les patients explorés pour un PSA compris entre 2,5 et 10 ng/ml, 75 % ont des biopsies négatives. A contrario, 10 à 35 % de ces patients sont diagnostiqués ultérieurement pour un adénocarcinome prostatique lors de biopsies répétées.

Sa deuxième fonction dans la prise en charge actuelle est **pronostique**. L'augmentation du PSA est indépendamment corrélée à l'agressivité du CaP. Un CaP à PSA élevé aura plus de risque d'avoir une extension extraprostatique, un envahissement des vésicules séminales, une extension métastatique et un score de Gleason élevé. Classiquement, un PSA > 100 ng/ml témoigne dans 100% des cas de l'existence de métastases osseuses. Le taux de PSA est donc un des critères de définition des trois groupes à risque de d'Amico, précédemment cités. Un PSA <10 ng/ml peut encore témoigner d'un CaP à faible risque alors qu'un PSA >20 ng/ml définit à lui seul un CaP à risque élevé. Toutes les études de résultats oncologiques après traitement curatif soulignent l'impact du PSA pré-traitement en tant que facteur prédictif indépendant de récurrence biologique et de survie globale après traitement. La réponse PSA après mise en route d'un traitement médical (castration ou chimiothérapie) est également un facteur prédictif majeur de sensibilité du CaP au traitement, et donc de survie sous traitement.

Ainsi, malgré les imperfections de ce marqueur, le PSA reste actuellement incontournable dans la prise en charge du CaP, du diagnostic jusqu'à la mise en route des traitements médicaux lors de la résistance à la castration.

II.1.2 Variations autour du PSA total

(i) Rapport PSA libre sur total

Pour améliorer la spécificité du PSA dans la zone « grise » (PSA compris entre 4 et 10 ng/ml), une mesure du rapport PSA libre sur PSA total peut être indiquée. Un rapport relativement bas du PSA libre sur le PSA total (<15%) est plus particulièrement observé chez les patients développant un cancer de la prostate alors qu'un ratio > à 25%, est plutôt en faveur d'une Hyperplasie bénigne de la prostate (Catalona et al., 1998). Cependant, cette mesure du PSA libre n'apporte pas d'élément pronostique pertinent dans la prise en charge du CaP après diagnostic.

(ii) Vitesse du PSA

L'évolution du taux de PSA au cours du temps peut être le signe d'un cancer y compris chez les patients avec des taux de PSA inférieur à 4ng/ml (Carter et al., 1992). Une vitesse d'augmentation du PSA supérieure à 0,75ng/ml/an est ainsi volontiers associée au risque de cancer. La vitesse du PSA a également une valeur pronostique importante. La vitesse du PSA avant traitement a ainsi été significativement associée à la survie sans récurrence et à la survie sans métastases après traitement radical (Patel et al., 2005 ; Palma et al., 2007 ; O'Brien et al., 2009 ; King et al., 2007, Wo et al., 2009). La valeur seuil de 2 ng/ml/an a été retenue par King et al, comme valeur discriminante pour l'évaluation du risque de récurrence après prostatectomie totale. Dans un modèle clinique, le risque relatif de mourir du CaP était près de 10 fois supérieur en cas de vitesse > 2. Des études de radiothérapie et curiethérapie ont également rapporté cet impact pronostique (Palma et al., 2007 ; Rossi et al., 2008). La vitesse du PSA est donc un facteur important dans l'évaluation initiale du risque de récurrence et participe à la décision thérapeutique. Ce facteur est probablement sous-utilisé dans l'évaluation initiale du CaP et n'est que peu intégré aux modèles statistiques publiés. En cas de récurrence biologique, le calcul de la vitesse du PSA apparaît également être un facteur prédictif de la réponse du CaP au traitement de cette récurrence. Une revue récente de la littérature a toutefois souligné le faible apport de la vitesse du PSA dans la décision thérapeutique, comparativement au PSA seul (Vickers et al., 2009).

La vélocité du PSA est actuellement un critère important dans le suivi des patients sous surveillance active (van den Bergh et al., 2008). Dans la plupart des séries, une valeur seuil de vélocité <3 ans est considérée comme un facteur amenant le clinicien à arrêter la surveillance et à proposer au patient un traitement radical. Ross et l'équipe du Johns Hopkins ont cependant récemment contesté la prise en compte de la vélocité du PSA comme élément de surveillance, leurs données à moyen terme nécessitent cependant une confirmation à plus long terme. Les patients avec une vélocité de PSA élevé avaient en effet une tendance non significative à avoir des CaP plus agressifs au cours des biopsies systématiques réalisées au cours du suivi (Ross et al., 2010).

II.2 Biomarqueurs tissulaires

La recherche de biomarqueurs dans le CaP a longtemps été dominée par des études d'immunohistochimie, et un grand nombre de marqueurs ont été proposés (Bjartell et al., 2011). Cependant, la quasi-totalité de ces marqueurs n'ont pas trouvé de pertinence clinique et ne sont pas utilisés en pratique courante. Ce gap important entre paillasse et pratique clinique s'explique aussi bien par la subjectivité d'interprétation de l'immunohistochimie, par l'hétérogénéité des CaP que par l'insuffisance méthodologique et statistique de la plupart des études publiées. Ainsi, les études de validation de ces marqueurs manquent cruellement. Les principaux marqueurs tissulaires pronostiques publiés sont exposés à la suite de ce paragraphe.

II.2.1 Kallibréines

Le locus chromosomique KLK code pour 15 gènes localisés sur le 19q13-4 (Harvey et al., 2000). Le gène le plus connu est celui codant pour la kallibréine 3, plus souvent appelé PSA. La kallibréine de type 2 (hK2) est identique au PSA en structure et est surexprimée dans les cellules cancéreuses (Darson et al, 1997). Lintula et al. ont démontré que le ratio de transcrits hK2/PSA augmenté avec le grade de la tumeur (Lintula et al, 2005). En utilisant des puces tissulaires construites à partir de 3 261 pièces de prostatectomies totales, Ebersdobler et al ont montré que la perte d'expression tissulaire du PSA était significativement associée à des cancers plus agressifs et plus avancés localement (Ebersdobler et al, 2009). De larges études immunoistochimiques intégrant toute la famille des kallibréines font cependant actuellement

défaut dans la littérature actuelle.

II.2.2 Antigène de membrane spécifique à la prostate (PSMA)

Le PSMA est une protéine membranaire exposée à la surface cellulaire qui offre une perspective intéressante de ciblage thérapeutique par anticorps ciblés. Le PSMA est en effet spécifique de la prostate et surexprimé dans les cellules cancéreuses. (Bostwick et al., 1998). Une forte expression à la surface de PSMA a été corrélée de manière indépendante à la récurrence biologique après chirurgie dans une étude TMA (Perner et al., 2007). Ces données encourageantes doivent être validées sur des cohortes externes de patients.

II.2.3 Ki-67

L'expression de la protéine Ki-67 est couramment utilisée comme marqueur de prolifération cellulaire dans de nombreux cancers, et a été rapportée comme étant un facteur prédictif de mauvais pronostic dans le CaP, dans des séries de prostatectomies totales, radiothérapie ou traitement hormonal. Sa valeur prédictive indépendante du score de Gleason et d'autres paramètres pronostiques n'est cependant pas démontrée (Veltri et al., 2008). Dans une série de 808 patients ayant subi une résection trans-urétrale de prostate, la valeur de Ki-67 ressortait comme prédictive de survie globale indépendamment du PSA, du score de Gleason ou de nombre de copeaux envahis (Berney et al., 2009). Ces données n'ont pas été confirmées par une étude récente (Donovan et al., 2011).

II.2.4 NKX3.1

L'expression de NKX3.1 est inversement corrélée à la prolifération des cellules prostatiques. NKX3.1 (8p12-21) code pour une protéine impliquée dans la morphogénèse des canaux prostatiques et dans la différenciation des cellules épithéliales prostatiques. Son expression est androgéno-dépendante. Des délétions de la région codant pour ce gène sont observées dans près de 85% des cancers de la prostate (He et al., 1997). Bien qu'elle puisse être corrélée au stade tumoral, une perte d'expression complète est rarement observée (Bowen et al., 2000). La réduction de l'expression de NKX3.1 conduit, chez les souris hétérozygotes pour ce gène, à des lésions d'hyperplasie et des dysplasies précoces. La diminution de l'expression de NKX3.1 dans les stades précoces de la carcinogénèse prostatique pourrait être en relation avec une baisse d'expression de certains gènes eux-mêmes potentiellement impliqués dans le cancer de la prostate tels que CDKN1B/p27^{Kip1}, PTEN ou encore TP53 (Lei et al, 2006). L'expression de NKX3.1 apparaît corrélée à la progression et la récurrence du CaP, mais de

larges études font actuellement défaut (Ouyang et al., 2008).

II.2.5 PTEN

PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (10q23.31) est un régulateur négatif de la voie de signalisation de la phosphoinositol-3-kinase-Akt (PI3K-AKT). Véritable interrupteur biologique, la protéine Akt oscille entre un état inactif et un état actif, au cours duquel elle déclenche des cascades protéiques permettant de conduire le signal contrôlant des mécanismes fondamentaux de la cellule tels que la prolifération, la migration ou encore l'apoptose. L'inactivation est fréquente au cours du carcinome prostatique. Elle résulte très souvent de délétions (Gray et al., 1995) et semble être corrélée au stade tumoral (Dong et al., 1998). Des expérimentations suggèrent son association avec la survenue de métastases (Abate-Shen et al., 2003; Bandyopadhyay et al., 2004). Une diminution de l'expression de PTEN et de fait une activation de la voie de la PI3K dans les tissus prostatiques tumoraux ont été corrélés à des scores de Gleason élevé, un stade avancé et à la résistance à la castration (McMenamin et al., 1999; Bertram et al., 2006). Ces données pourraient avoir un impact clinique avec l'ouverture d'essais thérapeutiques incluant des agents ciblant les protéines clés de la voie de la PI3K (Morgan et al., 2009).

II.2.6 Récepteur des androgènes

Nous avons présenté précédemment le rôle majeur du récepteur des androgènes dans la croissance prostatique et la progression tumorale vers la résistance à la castration. L'expression du RA a également été évaluée comme facteur pronostique dans le tissu hormonaïf. Li et al ont ainsi corrélé le niveau d'expression du RA aux variables pronostiques classiques du CaP (Li et al., 2004). Un niveau élevé d'expression était associé aux marqueurs de prolifération et ressortait comme facteur prédictif indépendant de récurrence biologique après prostatectomie totale. Cet impact pronostique du RA a été récemment confirmé avec la mise en évidence d'un lien avec la survie spécifique liée au CaP (Donovan et al., 2010). La seule immunohistochimie apparaît cependant comme insuffisante pour l'étude fonctionnelle du RA.

II.2.7 SPINK1 (*serine peptidase inhibitor, Kazal type1*).

Compte tenu que 40 à 70% des cancers semblent exprimer des gènes de fusion impliquant les gènes de la famille ETS, l'équipe d'Arul Chinnaiyan s'est attachée récemment à déterminer si d'autres gènes pouvaient subir de telles altérations. Il semblerait que SPINK1 soit exprimé

uniquement dans les cancers prostatiques qui ne présentent pas de fusion impliquant les gènes de la famille ETS. L'expression de ce marqueur est retrouvée dans environ 10 % des carcinomes prostatiques examinés et serait associée à des cancers plus agressifs que ceux exprimant les gènes de fusion. L'expression ne semble pas liée à un mécanisme de translocation (Tomlins et al., 2008b). La valeur pronostique de SPINK1 a récemment été confirmée par Leinonen et al (Leinonen et al., 2010).

II.2.8 HER2

La sur-expression ou l'amplification du récepteur au facteur de croissance épidermique 2 (HER2) est constatée dans 20-25% des cancers du sein et corrélée au pronostic. La détermination du statut HER2 par immunohistochimie a intégré la routine de la prise en charge du cancer du sein, avec décision d'un traitement adjuvant par trastuzumab.

HER2 a été corrélé à la progression vers la résistance à la castration. Dans une récente méta-analyse, Neto et al. ont évalué l'impact de la sur-expression d'HER2 dans le CaP (Neto et al., 2010). Le risque relatif de mourir du CaP était augmenté de 1.63 en cas de sur-expression d'HER2 dans le tissu tumoral. Un lien significatif existe donc entre HER2 et récurrence/mortalité par CaP.

II.2.9 Heat shock protéines

Les Heat shock protéines (HSP) sont des molécules chaperonnes ayant pour fonction la protection cellulaire en réponse au stress. Elles sont importantes à l'homéostasie cellulaire dans le tissu normal mais sont fréquemment sur-exprimées dans les cellules cancéreuses. Le CaP sur-exprime notamment HSP60 et HSP70 (Lexander et al., 2005). Dans une étude de validation d'immunohistochimie, la valeur prédictive indépendante de HSP60 sur la récurrence biologique après prostatectomie totale a été démontrée, ainsi que sa corrélation à l'agressivité du CaP sur les données pathologiques de pièces de prostatectomie totale (Glaessgen et al., 2008). La protéine HSP90 semble également intéressante et pourrait interférer avec le récepteur des androgènes.

II.2.10 Gènes de fusion

Ces dernières années une des étapes décisives dans la compréhension des mécanismes liés à l'émergence du cancer de la prostate est sans conteste la découverte d'anomalies impliquant des gènes de la famille ETS (Kumar-Sinha et al., 2008). En 2005 et 2006, les équipes d'Arul Chinnaiyan et de Mark Rubin décrivaient, dans environ 70% des adénocarcinomes

prostatiques, l'existence de gènes de fusion impliquant des gènes de cette famille (ERG1, ETV1, ETV4) et le gène codant pour la protéine sérine protéase transmembranaire TMPRSS2 (Tomlins et al., 2006; Tomlins et al., 2005). La description initiale de Tomlins rapportait que 23 des 29 adénocarcinomes prostatiques analysés présentaient une fusion entre l'exon 4 des gènes ERG (21q22.3) ou ETV1 (7q22) et la partie 5' de TMPRSS2 (21q22.3) (**Figure 9**). Auparavant, le consensus était que de telles altérations étaient caractéristiques de certaines hémopathies malignes et sarcomes de l'enfant (Mitelman et al., 2004). Par la suite, d'autres équipes confirmaient que la fréquence de ces fusions était élevée (55 à 78%) dans les adénocarcinomes prostatiques (Soller et al., 2006; Wang et al., 2006) confortant cette nouvelle idée que ce type d'événement puisse aussi avoir un rôle dans les tumeurs solides qui représentent plus de 80% des décès par cancer. Les gènes de la famille ETS codent pour des facteurs de transcription intervenant dans les voies de signalisation régulant la croissance cellulaire, la différenciation, la réponse au stress et la tumorigenèse. La sérine protéase transmembranaire 2 (TMPRSS2) est un multimère à domaines sérine-protéase. Elle est fortement exprimée au niveau de la prostate (Lin et al., 1999) et sa surexpression est observée dans 40% des adénocarcinomes prostatiques (Vaarala et al., 2001). Le gène TMPRSS2 possède dans son promoteur des éléments de réponse aux androgènes. Ainsi, la fusion 5'TMPRSS2 et ERG serait responsable, sous l'influence d'une stimulation androgénique, de la surexpression de ERG et ses cibles. Ceci atteste une nouvelle fois du rôle des androgènes dans le cancer de la prostate. De la même manière, une régulation androgéno-dépendante est retrouvée dans des fusions impliquant les gènes ETV1 ou ETV4 avec des régions promotrices autres que celles de TMPRSS2 (Tomlins et al., 2007); Hermans et al., 2006) (**Figure 9**). Il convient de noter également que les gènes ETS pourraient fusionner avec d'autres régions conduisant cette fois à une expression indépendante de la présence d'androgènes (Kumar-Sinha et al., 2008; Tomlins et al., 2007) (**Figure 9**). Dans ce cas, il a été proposé que de tels événements puissent contribuer à l'émergence de certains clones cellulaires au cours de la pression de sélection exercée par les traitements hormonaux. Néanmoins, ces remaniements constitueraient en premier lieu un événement précoce dans la genèse du cancer prostatique puisqu'ils sont observés dans environ 20% des lésions PIN de haut grade (Cerveira et al., 2006). De plus, bien qu'*in vitro* l'étude fonctionnelle des ces gènes ait identifié un rôle potentiel dans le pouvoir invasif des cellules, il est à noter que les souris transgéniques surexprimant ERG ou ETV1 dans les cellules prostatiques développent uniquement des lésions précancéreuses PIN (Tomlins et al., 2007; Tomlins et al., 2008a). Chez les patients, le type de fusion rencontré semble avoir une valeur pronostique (Perner et al., 2006; Wang et al.,

2006). Le pouvoir pronostic de la présence d'une telle anomalie au niveau de la prostate n'est cependant pas encore complètement déterminé puisque certains auteurs y voient un pronostic défavorable (Demichelis et al., 2007) tandis que d'autres y attribuent un pronostic favorable (Saramaki et al., 2008). De plus, des études suggèrent le caractère hétérogène des anomalies au sein d'une même tumeur (Clark et al., 2007). La signification pronostique de ces fusions a été évoquée par plusieurs études de cohortes de patients présentant une tumeur localisée sous simple surveillance watchful waiting et ont retrouvé un impact négatif, avec une diminution de la survie spécifique en cas de fusion TMPRSS2—ERG (Demichelis et al., 2007). La présence de ces gènes de fusion semble être corrélée aux autres critères d'agressivité tumorale : stade (pT3), marges positives, métastase ganglionnaire et score de Gleason élevé. Sur la base d'une revue récente de la littérature, Rubin et al. concluaient que parmi les patients avec CaP inclus en surveillance, les CaP avec fusion TMPRSS2—ERG progressaient de manière plus significative que les CaP sans fusion (Rubin et al., 2011). En revanche, les données actuelles de la littérature ne permettaient de conclure quant à la valeur pronostique des fusions parmi les patients avec CaP ayant subi un traitement local.

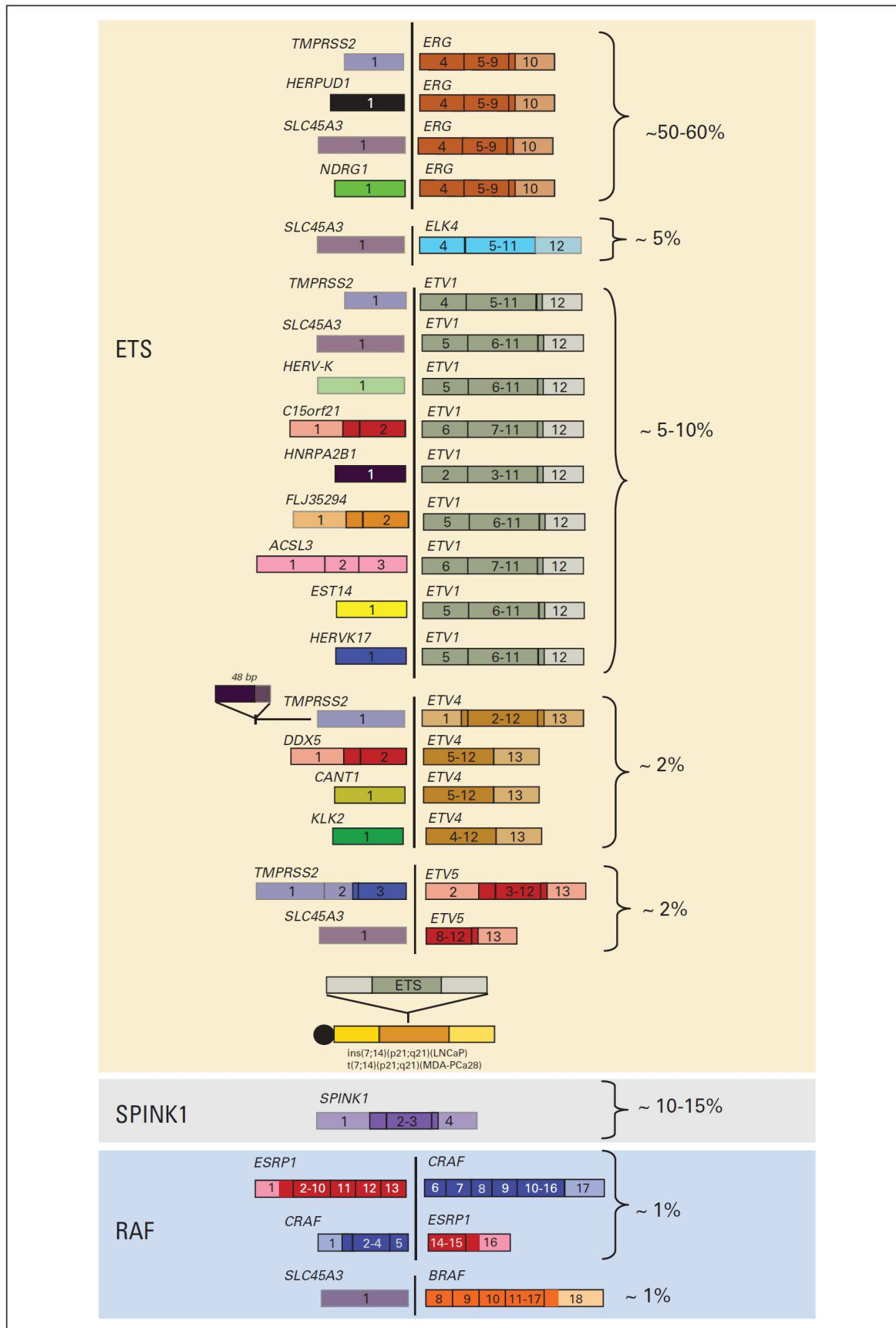


Figure 9. Gènes de fusion dans le cancer de la prostate. Ce schéma présente les principaux gènes de fusion caractérisés dans le cancer de la prostate. Sur la gauche est représentée la partie 5' du gène

partenaire de la fusion et sur la droite la partie 3' du gène ETS impliqués dans la fusion. (D'après Rubin et al., 2011)

II.3 Biomarqueurs sériques

L'étude du tissu tumoral reste le "gold standard" de l'analyse des facteurs potentiellement impliqués dans le pronostic et l'évolutivité de la maladie prostatique. Cependant, devant l'hétérogénéité du CaP et de son caractère multifocal, elle a également ces limites, notamment l'échantillonnage du tissu analysé, lors des biopsies prostatiques et même lors des études TMA sur pièces de prostatectomies totales. D'autre part, il est difficile d'obtenir chez un patient du tissu tumoral analysable tout au long de la maladie prostatique. Pour des raisons éthiques, il n'est pas possible de biopsier régulièrement ces patients. Cependant, le tissu tumoral se modifie sous l'effet de la castration. En effet le tissu recevant au moment de l'échappement hormonal une nouvelle ligne d'agent thérapeutique ne sera plus le même que celui prélevé par biopsies au diagnostic de la maladie. Un fort intérêt s'est porté ces dix dernières années sur les marqueurs issus de fluides biologiques notamment dans le sérum. Rappelons que le marqueur de référence, le PSA, est dosé dans le sérum.

II.3.1 ProPSA

Une façon d'améliorer la valeur informative du PSA a été de créer des outils dérivés du PSA : le taux de PSA en fonction de l'âge, la vélocité du PSA et la densité du PSA comme rapporté plus haut. En outre, le PSA libre existe lui-même sous trois isoformes distinctes dans le sérum : le proPSA, le BPSA et le PSA libre intact (Benchikh et al., 2007). La première de ces trois isoformes, est une pré-pro-protéine de 261 acides aminés dont le clivage par la *human kallikrein-related peptidase 2* de l'homme (hK2) produit la forme mature du PSA. Des ratios élevés proPSA/PSA libre ont été rapportés comme associés à des caractéristiques histopathologiques agressives et à une diminution de la survie sans récurrence biologique après prostatectomie radicale (Catalona et al., 2003 ; Peyromaure et al., 2004). Un nouvel outil automatisé intégrant le dosage du proPSA et le ratio de PSA libre dans un réseau neuronal artificiel a ainsi permis de détecter les pCa et les cancers les plus agressifs avec une précision plus élevée que le PSA total ou le pourcentage de PSA libre (Stephan et al., 2009). Dans une cohorte prospective récente d'hommes enrôlés dans des protocoles de surveillance active pour le CaP, les taux de proPSA étaient associés à la nécessité de traitements ultérieurs (Makarov et al., 2009).

II.3.2 L'*human kallikrein-related peptidase 2*

L'hK2 (aussi connue sous le nom de *human kallikrein-related peptidase 2*) est une sérine protéase de la même famille de gènes que le PSA. L'hK2 sérique est présente sous deux formes dans le sang : l'une liée à différents inhibiteurs de protéase et l'autre (prépondérante) libre dans la circulation. Plusieurs études ont montré que, lorsqu'il est utilisé conjointement avec le PSA libre et total, le taux d'hK2 sérique permet d'améliorer sa valeur prédictive positive dans le dépistage du CaP (Becker et al., 2000). Il a également été suggéré que hK2 pouvait être associée à un grade de Gleason plus haut, une extension extracapsulaire et un taux plus élevé de récurrence biologique chez les patients traités par prostatectomie radicale (Haese et al., 2001). Toutefois, cette constatation n'a pas été validée par d'autres auteurs.

II.3.3 L'activation du plasminogène urokinase (uPA)

L'activation de l'uPA intervient dans différentes phases du développement tumoral, et plus particulièrement dans la dégradation de la matrice extracellulaire lors de la progression tumorale. Le précurseur inactif de la sérine protéase uPA se lie à un récepteur de la surface cellulaire soluble et spécifique (uPAR), ce qui induit la transformation du plasminogène en plasmine. Les études immuno-histochimiques réalisées sur des pièces de prostatectomie totale ont révélé que la surexpression à la fois de uPA et de son inhibiteur (PAI-1) était associée à un taux accru de récurrence biologique (Gupta et al., 2009). Au niveau sérique, une augmentation des concentrations des différentes formes de uPA est associée à un mauvais pronostic dans différents cancers. Dans le cancer de la prostate, des taux élevés d'uPA et d'uPAR circulants ont été retrouvés de façon statistiquement significative associés à un stade avancé de la maladie et à la présence de métastases osseuses. Dans une étude de 423 patients traités par prostatectomie totale, le taux d'uPA plasmatique préopératoire était un puissant prédicteur de la récurrence biologique (Svatek et al., 2008). L'uPA et l'uPAR préopératoires ont ainsi été associés à la récurrence biologique et au développement de métastases à distance, suggérant une association avec une maladie métastatique occulte au moment de la thérapie locale. De larges études sont actuellement en cours pour valider le rôle potentiel de l'uPA et de l'uPAR comme marqueurs du CaP métastatique.

II.3.4 Le *transforming growth factor-beta 1* (TGFβ-1) et l'Interleukine-6 (IL-6)

Le TGFβ-1 est un facteur de croissance favorisant la progression des cellules dans les modèles de pCa et son expression locale a été associée à la présence d'un plus haut grade tumoral et à la présence de métastases chez les patients présentant un CaP (Shariat et al.,

2004). Plusieurs études ont montré que des taux élevés de TGF β -1 circulants sont associés à la progression du pCa ainsi qu'à la présence de métastases occultes ou documentées et à la progression biologique du cancer. Plusieurs auteurs ont rapporté que des taux sériques élevés d'IL-6 et d'IL-6R étaient associés à une évolution métastatique de la maladie et au développement de son hormono-résistance, et ont suggéré que l'IL-6 pourrait prédire la progression et la survie des patients porteurs d'un CaP (Michalaki et al., 2004). Sur la base de ces constatations, Kattan et al. ont développé et validé de façon interne un modèle pronostique incorporant le TGF β -1 et l'IL-6R dans un nomogramme visant à prédire la récurrence biologique après prostatectomie radicale. Cette combinaison de marqueurs sériques aux paramètres cliniques classiques a ainsi permis d'améliorer la valeur prédictive du nomogramme de 75 à 84 %. Une étude réalisée sur une cohorte prospective indépendante de 423 patients traités par prostatectomie totale a permis la validation externe de ce nomogramme préopératoire prédictif de la récurrence biologique en estimant sa précision à 87,9 % contre 71,1 % pour le nomogramme standard ($p < 0,001$) (Svatek et al., 2008).

II.3.5 L'Endoglin

L'Endoglin ou CD 105 est une glycoprotéine transmembranaire généralement exprimée par les cellules endothéliales vasculaires. Fonctionnellement, c'est un co-récepteur des *transforming growth factors* β 1 (TGF- β 1) et β 3 (TGF- β 3), qui module la réponse cellulaire au TGF- β dans les étapes précoces de la prolifération des cellules endothéliales. Son rôle est essentiel dans l'angiogenèse. Dans le CaP, l'Endoglin est préférentiellement trouvée sur les néo-vaisseaux (Wikstrom et al., 2002). Les taux plasmatiques d'Endoglin préopératoires ont été associés à la présence de métastases aux ganglions lymphatiques régionaux (Karam et al., 2008 ; Svatek et al., 2008), à l'agressivité du CaP (présence de marges chirurgicales, score de Gleason élevé), et à un plus haut taux de récurrence biologique après prostatectomie totale. D'autres investigations sont nécessaires pour valider l'Endoglin comme biomarqueur sérique utile chez les hommes présentant un CaP.

II.3.6 Cellules tumorales circulantes (CTC)

La présence de CTC dans la circulation sanguine semble une condition nécessaire à la diffusion métastatique. La quantification des CTC par le système CellSearch[™] a reçu l'homologation de la FDA américaine comme marqueur pronostique utilisé dans la surveillance sous traitement des patients avec CaP métastatique. Le nombre de CTC apparaît donc comme un facteur pronostique de la survie des patients métastatiques (Danika et al.,

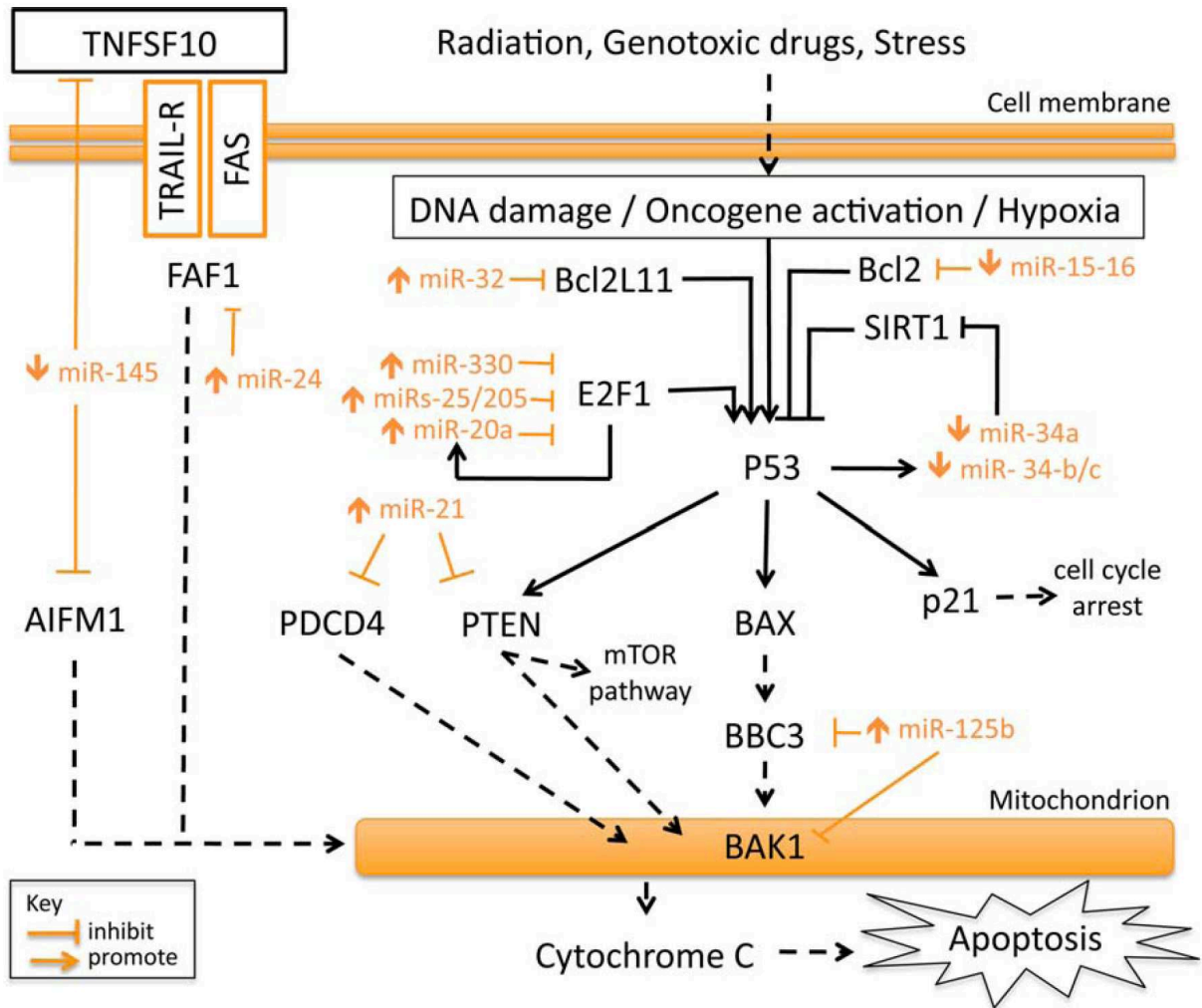
2011), mais le profil moléculaire de ces CTC semble également intéressant (qualitatif). L'étude moléculaire de ces CTC est cependant difficile en raison du faible nombre de cellules recueillies et de la contamination par les cellules sanguines circulantes. La recherche des CTC aura peut-être à l'avenir une place importante avant décision thérapeutique chez les patients résistants à la castration. Dans les formes localisées ou localement avancées, la recherche de CTC ne semble pas apporter d'intérêt pronostique.

II.3.7 MicroARN

Les Micro ARN (miRNA) sont de petits (moyenne 22 bases) ARN non codants qui participent à la régulation post-transcriptionnelle des ARN codants par mécanismes dits épigénétiques (*Figure 10*). Ils se lient de manière complémentaire aux ARN codants et altèrent ainsi la fonction de ses derniers. Ils bénéficient actuellement de nombreux efforts de recherche dans de nombreux cancers. Des altérations de leur expression et de leur fonction ont été observées dans le CaP et représentent ainsi un champ de biomarqueurs potentiels (Catto et al., 2011). Brase et al ont recherché dans le sérum 667 miARN dans un petit échantillon de patients atteints de CaP localisés et métastatiques (Brase et al., 2011). Ils ont ainsi identifié deux miARN comme biomarqueurs pronostiques potentiels, miR-141 et miR-375. Lodes et al ont rapporté 15 miARN sur-exprimés dans le CaP dont miR-141, associé uniquement aux CaP avancés (Lodes et al., 2009).

Zhang et al ont associé le miR-21 sérique avec la résistance des CaP au docétaxel dans une cohorte de patients résistants à la castration (Zhang et al. 2011). Saini et al ont démontré un lien entre miR-203 et la progression vers la maladie métastatique osseuse (Saini et al. 2011).

Figure 10. Principaux mi-ARM identifiés comme potentiellement incriminés dans le CaP. (D'après Catto et al., 2011).



II.4 Biomarqueurs urinaires

Le développement de nouveaux marqueurs du CaP devient une nécessité, afin d'améliorer la détection de la maladie et de discriminer les formes agressives nécessitant un traitement. Délaissant l'approche invasive de l'exploration tissulaire et biopsique, un fort intérêt s'est porté ces dix dernières années sur les marqueurs issus de fluides biologiques et en particulier les urines. Le recueil d'urines, disponible, peu invasif, place ces marqueurs en situation de candidats idéaux au diagnostic ainsi qu'au cours du suivi de la maladie prostatique. Contrairement au sérum qui ne permet que l'accès aux molécules sécrétées par la prostate, le recueil urinaire permet directement l'accès aux cellules prostatiques, recueillies après massage prostatique ou non, dans le premier jet d'urines. Etant donné l'engouement actuel pour la recherche de biomarqueurs dans le fluide urinaire, nous avons choisi de présenter dans cette thèse les valeurs pronostiques mais également diagnostiques de ces marqueurs urinaires (Ploussard et de la Taille, 2010). Trois groupes de marqueurs urinaires ont été distingués : marqueurs d'ADN, d'ARN et protéiques (*Tableau 4*).

ADN	ARN	Protéines
Hyperméthylation : GSTP-1 Autres gènes (RASSF,ARF...)	PCA3	Annexine-3
	Gènes de Fusion (TMPRSS2:ERG,...)	Métalloproteases
	AMACR	PSA urinaire
	GOLPH2 (GOLM1)	Sarcosine
	Téломérase	Téломérase

Tableau 4. Principaux marqueurs du fluide urinaire ayant montré un intérêt diagnostique ou pronostique dans le CaP.

II.4.1 Marqueurs d'ADN

A- Méthylation aberrante de l'ADN

L'hyperméthylation de gènes (liaison d'un radical méthyl (CH₃) à une cytosine en 5', dans des régions promotrices riches en cytosine, appelées îlots CpG) à différents sites a été associée à la survenue de nombreux carcinomes. Plusieurs gènes d'intérêt ont été mis en évidence pour le CaP (Rouprêt et al., 2007). La révélation des méthylation d'ADN repose sur le traitement des acides nucléiques par le sodium bisulfite à l'origine d'une désamination des cytosines non méthylées en uracile. Une altération épigénétique non analysable est ainsi transformée en un polymorphisme de séquence accessible aux techniques usuelles de biologie moléculaire, en particulier la Polymerase chain reaction (PCR).

B- GSTP1

La perte d'expression du gène glutathion-S-transférase P1 (GSTP1) consécutive à l'hyperméthylation de son promoteur est l'altération moléculaire la plus fréquemment rapportée dans le CaP (Harden et al., 2005). GSTP1 a un rôle de détoxification et de protection de l'ADN vis-à-vis des radicaux libres. La méthylation du gène GSTP1 à partir d'échantillons d'urine a été étudiée dans diverses séries. La spécificité de ce test pour la détection du CaP varie entre 93 et 100 %, sa sensibilité de 21,4 à 38,9% (Cairns et al., 2001; Jeronimo et al., 2002). La standardisation du prélèvement d'urines (massage prostatique) a amélioré la sensibilité à 75 % (Woodson et al., 2008).

C- Panels de gènes d'intérêt

Trois études ont évalué les performances diagnostiques d'exploration de panels de gènes d'intérêt, incluant toutes GSTP1 (Hoque et al., 2005). Hoque et al. ont examiné la méthylation de neuf promoteurs de gènes et a constaté que la combinaison de quatre d'entre eux (p16, ARF [P14], MGMT et GSTP1) positifs a une sensibilité de 87 % et une spécificité de 100 %. Pour Rouprêt et al., la méthylation d'au moins un promoteur a été détectée dans tous les échantillons d'urine de 52 cas de cancer. Il n'a pas trouvé de corrélation entre la présence de cancer et la méthylation de p14 ou p16. La combinaison de gènes (GSTP1, RASSF1a, RARB et APC) semble être le meilleur panel discriminant, avec une sensibilité de 86 % et une spécificité de 89 % (Rouprêt et al., 2007). Payne a exploré quatre gènes (RASSF2, HIST1H4K, TFAP2E et GSTP1) et n'a pas trouvé le rendement diagnostique nettement amélioré par rapport à un marqueur unique. L'aire sous la courbe (ASC) des quatre gènes testés variait de 0,64 à 0,69 pour discriminer les patients avec des biopsies positives. De tous les marqueurs inclus dans ces études, la méthylation GSTP1 offre les meilleures performances diagnostiques. Enfin, une étude prospective multicentrique a testé 337 échantillons d'urine

prélevés après un toucher rectal (178 cancers et 159 non cancéreux) par recherche de méthylation PCR de trois gènes d'intérêt (GSTP1, RARB et APC). Les auteurs ont démontré qu'un tel test apporte un gain dans le processus de décision de réalisation de biopsie. Dans cette série, qui a inclus des patients de neuf centres, l'ASC du test de détection de cancer a été de 0,72, supérieure à l'ASC du PSA sérique seul (en utilisant un seuil de 4,0 ng/ml). La valeur prédictive positive a été 54 % chez les hommes avec un PSA compris entre 2–4 ng/ml et la valeur prédictive négative était de 87 % avec un PSA compris entre 4–10 ng/ml. Ces résultats prometteurs placent les biomarqueurs de méthylation comme candidat à la détection du CaP. D'autres marqueurs ADN ont été étudiés (Chion et al., 2003 ; Thuret et al., 2005).

II.4.2 Marqueurs d'ARN

A- PCA3

La découverte à la fin des années 1990 du gène PCA3, le développement rapide des techniques de quantification des ARNm PCA3 et les répercussions cliniques importantes font l'objet d'un paragraphe séparé à la fin de la partie Introduction. L'évaluation pronostique pré-opératoire du score urinaire PCA3 est un des objectifs des travaux de cette thèse.

B- Gènes de fusion

La découverte des gènes de fusion dans le CaP et leur intérêt clinique ont été décrits dans le paragraphe « Biomarqueurs tissulaires ». Cependant, comme l'ont montré Laxman et al., il est possible par technique PCR, à partir des urines de patients atteints de CaP localisé après massage prostatique, de mettre en évidence la présence de transcrits de fusion : 42 % des 19 patients porteurs d'un CaP de cette étude étaient positifs, la présence de ce gène de fusion a été contrôlée par un test tissulaire d'immunofluorescence (Laxman et al., 2006). Hessels et al. ont exploré les sédiments urinaires de 108 patients porteurs d'un CaP à la recherche de TMPRSS2-ETS (Hessels et al., 2007b). La sensibilité et la spécificité du test par RT-PCR ont été de 37 et 93 %. Les valeurs prédictives négatives et positives, respectivement de 34 et 94 %. La présence de TMPRSS2-ETS n'a pas été corrélée au Gleason biopsique. La combinaison PCA3 et TMPRSS2-ETS a conduit à une sensibilité de 73 % pour la détection du CaP.

C- AMACR

La surexpression d'AMACR (isomérase impliquée dans la bêta-oxydation des chaînes ramifiées des acides gras et dérivés) dans le tissu prostatique tumoral est un facteur épidémiologique important, puisque la principale source d'acides gras se trouve dans le bœuf et les produits laitiers, dont la consommation excessive est corrélée au risque de CaP. Le taux de transcription d'ARNm AMACR rapporté à celui d'ARNm PSA semble avoir une valeur prédictive significative de CaP. L'association PCA3 et AMACR sur une cohorte de 92 patients a montré des performances de détection intéressantes. Le score AMACR a été affecté d'une sensibilité de 70 % et d'une spécificité de 71 %. Ces chiffres atteignent 81 et 84 % si l'on considère la combinaison des deux marqueurs (Ouyang et al., 2009).

D- GOLM1

La surexpression tissulaire des transcrits Golgi Membrane Protein-1 (GOLM1, protéine impliquée dans les transferts moléculaires du réticulum endoplasmique) semble être significativement prédictive du CaP. L'étude des transcrits urinaires de GOLM1 a dépassé les performances diagnostiques de détection du PSA (ASC = 0,622 versus 0,495) dans une étude où sensibilité, spécificité et valeurs prédictives positives et négatives étaient respectivement de 59, 71, 73 et 49 %. L'augmentation de l'expression de GOLM1, protéine impliquée dans les transferts moléculaires du réticulum endoplasmique, a été constatée dans le tissu prostatique cancéreux. Laxman et al. ont montré que la surexpression tissulaire des transcrits GOLM1 était significativement prédictive du CaP (Laxman et al., 2008). Une étude plus large a analysé les échantillons d'urines de 195 patients atteints de CaP localisé et 124 cas témoins (biopsies négatives) (Varambally et al., 2008). GOLM1 ARNm a dépassé les performances diagnostiques de détection du PSA (AUC 0,622 vs 0,495). La sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative ont été respectivement de 59, 71, 73 et 49 %. Par ailleurs, l'expression protéique de GOLM1 urinaire a été trouvée significativement augmentée dans le groupe CaP (75 vs 28 %) par rapport au groupe témoin.

E- Analyse multiplexe ARNm

Il incombe aux analyses multiplex la tâche d'augmenter la sensibilité de détection de la maladie, sans sacrifier la spécificité du test. Dans ce contexte, Laxman et al. ont mené une étude fondée sur l'amplification par PCR quantitative de l'ensemble du transcriptome urinaire chez 152 hommes atteints de CaP et 105 sujets témoins. L'expression des transcrits de GOLM1, SPINK1, PCA3 et de TMPRSS2-ETS ont été significativement prédictifs de la détection du CaP. L'ASC ROC du panel multiplex était significativement plus importante que

celle du test PCA3 seul (0,758 versus 0,662). La sensibilité et la spécificité de la combinaison de ces quatre marqueurs étaient respectivement de 65,9 et 76,0 %. L'analyse de l'expression différentielle des ARNm de patients sains confrontée à celle de patients porteurs d'un CaP semble devenir un outil majeur du développement de nouveaux biomarqueurs.

F- Exosomes urinaires

Une nouvelle approche d'exploration des marqueurs prédictifs du CaP consiste en l'analyse des exosomes urinaires, vésicules sécrétées contenant des protéines et ARN fonctionnels. Plusieurs études ont montré une augmentation de la sécrétion d'exosomes chez des hommes atteints du CaP comparativement à des sujets sains. Les exosomes contiennent des acides nucléiques intacts que l'on peut amplifier plus sensiblement que l'ARN cellulaire. Nilsson et al. ont démontré que l'analyse du transcriptome dans les exosomes sécrétés est instructive, en mettant en évidence, à partir d'échantillon d'urine de patient atteint de CaP, deux marqueurs d'ARN connus : PCA3 et TMPRSS2-ERG (Nilsson et al., 2009).

II.4. 3 Marqueurs protéiques

A- Antigène spécifique de prostate sérique urinaire

La présence de PSA dans les urines après prostatectomie radicale a été reliée dès 1993 à la récurrence du CaP. Une étude prospective multicentrique s'est intéressée à la pertinence du ratio PSA urinaire/sérique dans la détection du CaP. Le rationnel de cette étude est la normalisation du PSA sérique par rapport à un taux constant (que le sujet soit atteint d'un CaP ou d'une hyperplasie bénigne) : le PSA urinaire. Cent soixante-cinq patients ont été explorés par biopsies prostatiques, positives pour 83 d'entre eux (Ikani et al., 2005). Pour un PSA compris entre 4 et 10 ng/ml, l'analyse des courbes ROC a montré que l'ASC du ratio (0,63) était supérieure à celle du PSA sérique (0,55) et celle du rapport PSA libre/total (0,60). Une étude prospective similaire plus récente a été conduite chez 170 patients. Dans un sous-groupe dont le PSA sérique était compris entre 1,5 et 10 ng/ml, le ratio PSA urinaire/sérique était significativement différent entre CaP et hyperplasie bénigne de prostate ($p = 0,007$). L'analyse de la courbe ROC a permis de fixer une valeur de PSA urinaire supérieure à 150 ng/ml pour une sensibilité de 95 % dans la détection du cancer.

B- Activité télomérase

TERT encode pour une télomérase transcriptase inverse qui joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité des extrémités chromosomiques. Son hyperactivité est rapportée dans 90 % des CaP. La sensibilité de TERT en détection du CaP varie entre 36 et 100 % et la spécificité entre 66 et 100 %, selon des études de faibles effectifs (Botchkina et al., 2005).

C- Annexine A3

L'annexine A3 (ANXA3) appartient à un groupe de protéines de transport calcique dont le rôle est l'échange transmembranaire, la migration lymphocytaire et la stimulation de la réponse immunitaire spécifique. Son expression tissulaire a été (inversement) corrélée à la présence et à l'agressivité (pT et score de Gleason) du CaP. L'association PSA et ANXA3 a récemment montré des performances diagnostiques synergiques (ASC = 0,81) (Schostak et al., 2009).

D- Métalloprotéines

Les métalloprotéines (MMP) de la matrice extracellulaire ont un rôle présumé dans la croissance, l'invasion tumorale et le pouvoir métastatique de nombreux cancers. La présence de MMP a une sensibilité de 82 % et une spécificité de 82 % pour la détection des CaP et semble constituer (pour MMP9), en analyse multivariée, un facteur prédictif indépendant (Roy et al., 2008).

E- Analyses protéomiques

Les plateformes protéomiques permettent l'analyse rapide de centaines de peptides, de caractériser leur signature métabolique et conduisent à l'identification de nouveaux marqueurs moléculaires du cancer. Cette approche participe à la compréhension des mécanismes de progression tumorale. L'approche protéomique offre l'avantage d'identifier les altérations post-transcriptionnelles et le niveau global d'expression protéique, qui n'est pas accessible aux techniques de biologie moléculaire basées sur la détection de l'ADN ou de l'ARN. Alors que l'analyse d'acides nucléiques nécessite l'excrétion de cellules dans l'urine, l'exfoliation épithéliale, la sécrétion de protéines peuvent être détectées probablement plus tôt dans le processus de cancérogenèse. Enfin, l'urine n'est pas un milieu de protéolyse intense contrairement au sérum ou au plasma sanguin.

Les premières expériences de profilage protéomique pour détecter le cancer de prostate ont été conduites par Rehman et al. qui ont identifié la calgranuline B (MRP14) comme marqueur potentiel du CaP (Rehman et al., 2004). Un essai prospectif, multicentrique, incluant

l'électrophorèse capillaire et la spectrophotométrie de masse, a ensuite porté sur 86 échantillons d'urines pour une série d'essai puis sur 264 patients pour une série de validation (Muller et al., 2008). Un panel de 12 peptides urinaires a été identifié comme étant prédictif de la présence de cancer sur les biopsies prostatiques. La plus importante étude de profilage métabolique dans le cancer de prostate a été conduite par Sreekumar et al. (Sreekumar et al., 2009). À partir de l'analyse de 262 prélèvements biologiques (tissus, urines, plasma) de patients cancéreux et de patients sains, en spectrographie de masse et chromatographie, cette étude a permis de séparer et identifier la composition atomique de 1126 métabolites. Parmi eux, six substances présentaient un profil métabolique suspect et en particulier la sarcosine, acide aminé naturel dérivé du N-méthyl de glycine. Le niveau de sarcosine s'est révélé plus élevé dans l'urine de patients souffrant d'un CaP métastatique dans 79 % des cas, plus élevé dans les prélèvements de patients porteur d'un CaP localisé dans 49 % des cas, par rapport à des sujets témoins dépourvus de sarcosine urinaire. Cependant, ces promesses de performance diagnostique ont été remises en cause très récemment par Jentzmlk et al. qui ont réalisé l'analyse en spectrophotométrie de masse de 103 échantillons d'urines de patients atteint de CaP et 33 patients témoins. La sarcosine n'a pas amélioré le pouvoir prédictif de détection du cancer du PSA total et a fait moins bien que le PSA libre (Jentzmik et al., 2010).

II.5 Perspectives

Le développement des biomarqueurs est un défi passionnant des années à venir, aux enjeux scientifiques importants. Néanmoins, ces études peinent à inclure de larges effectifs et à être construites selon une méthodologie solide. La communauté scientifique en a récemment pris conscience, éditant des recommandations visant à combler ces manques.

Actuellement, aucun marqueur ne peut distinguer formellement un CaP agressif d'un CaP non ou peu significatif. Plusieurs biomarqueurs semblent cependant intéressants. Actuellement, le PCA3, marqueur ARN urinaire a prouvé sa pertinence clinique dans la prédiction de positivité des biopsies prostatiques. Son coût limite cependant sa généralisation.

De nouvelles voies de recherche émergent. Le champ des « omics » (génomique, protéomique, métabolomique) et le développement des technologies à grande échelle (puces, bioinformatique) est cependant en train de bouleverser la découverte et l'évaluation des

biomarqueurs. L'identification d'un biomarqueur unique semble peu pertinente, et les données récentes convergent vers l'utilisation d'approches multiplex (profils d'expression génique, CGH, SNP) permettant la caractérisation moléculaire complète du tissu tumoral.

La recherche d'un nouveau biomarqueur doit toujours reposer sur un manque observé en pratique clinique, le but de ce biomarqueur sera d'améliorer la prise en charge des malades.

Ce biomarqueur sera pertinent d'un point de vue **pronostique** lorsqu'il permettra d'identifier les patients à fort risque de récurrence pour lesquels une thérapie adjuvante pourra améliorer la survie ou bien lorsqu'il permettra de sélectionner les CaP non significatifs candidats à une surveillance active.

Ce biomarqueur sera pertinent d'un point de vue **prédictif** lorsqu'il permettra de prédire la réponse au traitement proposé, et ainsi de sélectionner le meilleur traitement médical pour un patient donné.

Les deux biomarqueurs rapportés dans cette thèse ont été étudiés en gardant à l'esprit ces deux axes, d'après les données de la littérature :

- différencier CaP significatifs et non significatifs (pour le PCA3) ;
- prédire la réponse à la chimiothérapie par taxane (pour la β -tubuline de classe III).

III. β -tubuline de classe III : généralités et rôle dans la chimiorésistance

III.1. Microtubules et tubulines

Les microtubules sont des longues molécules polymérisables, essentielles au fonctionnement des cellules eucaryotes. Ils sont cruciaux dans la maintenance de l'architecture cellulaire, le transport des vésicules intracellulaires, dans la signalisation et la division cellulaire et notamment la formation du fuseau mitotique. Ces polymères sont composés d'hétérodimères d' α - et β -tubuline (environ 50 kDa) (**Figure 11**). Ils mesurent environ 25 nm de diamètre et se disposent radiairement à partir du centrosome dans le cytoplasme de la cellule en interphase (Kavallaris et al., 2010). Ces structures sont hautement dynamiques, alternant les périodes de polymérisation et de dépolymérisation. Cette dynamique des microtubules varie selon la phase du cycle cellulaire : lente pendant l'interphase (dont la durée varie selon le type cellulaire) ; rapide au cours de la période mitotique, avec un désassemblage de l'architecture puis la formation expresse d'un nouveau réseau de microtubules. La régulation de la formation de ce réseau doit être parfaitement contrôlée car elle est à l'origine de la ségrégation des chromosomes avant la division cellulaire. Cela implique l'intervention de protéines régulatrices associées aux microtubules (MAPs).

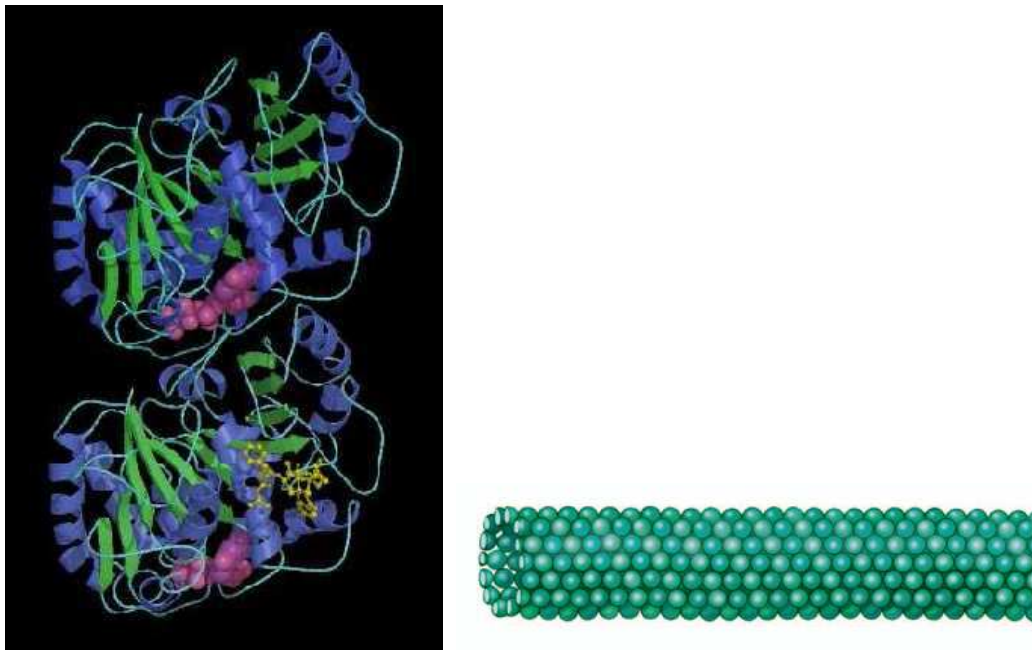


Figure 11. Représentation graphique d'un hétéro-dimère d' $\alpha\beta$ -tubuline (à gauche). Polymérisation en microtubule (à droite).

Les microtubules sont donc composés d'hétérodimères d' α - et β -tubuline. Ces deux protéines ont une expression isotypique tissu-dépendante, au moins sept isoformes de la β -tubuline sont ainsi connus, neuf pour l' α -tubuline (**Tableau 5**). Les isoformes de la β -tubuline diffèrent essentiellement dans leur séquence des 15 derniers acides aminés en position C-terminale. Cette séquence définissant l'isotype représente le site de liaison des protéines associées aux microtubules (MAPs) qui participent à la stabilisation du microtubule. Des modifications post-traductionnelles (phosphorylations) contribuent également à cette hétérogénéité isotypique (Luduena, 1998 ; Verdier-Pinard et al., 2009).

β -tubuline	Gène	Localisation	Expression tissulaire
βI	<i>TUBB</i>	6q21.33	Expression constitutive
βII	<i>TUBB2A/ TUBB2B</i>	6p25.2	Neurones Faible niveau : poumon, rein
βIII	<i>TUBB3</i>	16q24.3	Neurones, cellules de Sertoli
βIVa	<i>TUBB4</i>	19p13.3	Cerveau
βIVb	<i>TUBB2C</i>	9q34.3	Expression constitutive, ++ testis
βV	<i>TUBB6</i>	18p11.21	Utérus, endomètre
βVI	<i>TUBB1</i>	20q13.32	Cellules sanguines

Tableau 5. Différentes isoformes de la β -tubuline : symbole génique, localisation chromosomique et localisation tissulaire préférentielle.

III.2. Agents cytotoxiques ciblant les microtubules : les poisons du fuseau

Les poisons du fuseau (PF) sont des agents cytotoxiques fréquemment utilisés en cancérologie. Ils sont classés schématiquement en deux catégories (**Figure 12**):

- les agents stabilisants ou polymérisants, qui augmentent la fraction des tubulines polymérisées comme les taxanes (paclitaxel, docétaxel) et les épothilones ;
- les agents déstabilisants ou dépolymérisants, comme les vinca-alcaloïdes (vincristine, vinblastine).

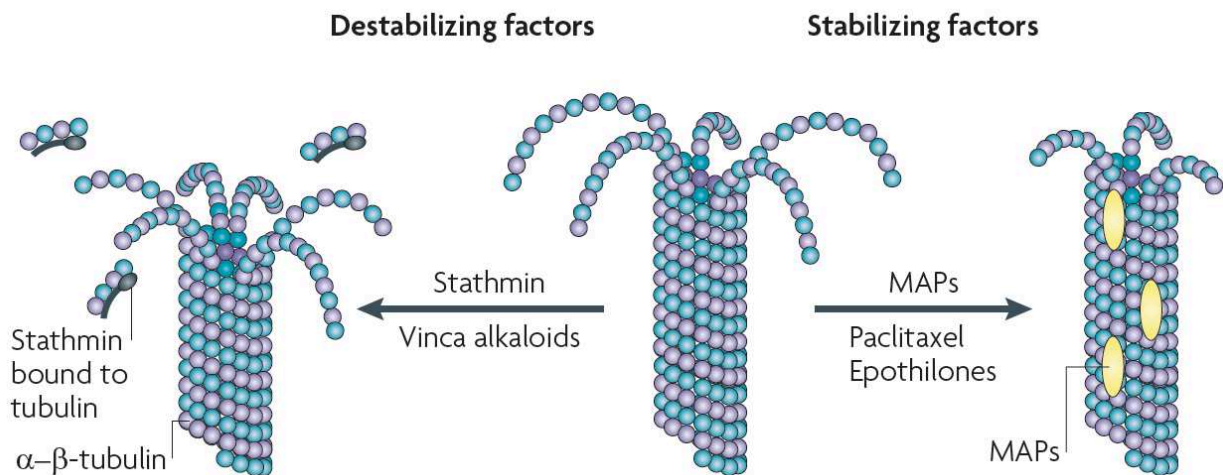


Figure 12. Agents cytotoxiques ciblant les microtubules : agents déstabilisants versus stabilisants. (D'après Kavallaris, 2010).

Les poisons du fuseau ciblent les microtubules, se fixent à la sous-unité β -tubuline et suppriment ainsi la dynamique du réseau des microtubules (Downing, 2000). Ils interfèrent ainsi dans le cycle cellulaire au cours de la formation du fuseau mitotique. Ils bloquent le cycle cellulaire à la phase de transition métaphase-anaphase provoquant la mort des cellules en prolifération (**Figure 13**). Les mécanismes précis de cet arrêt du cycle cellulaire et de la sensibilité des cellules tumorales restent encore débattus. La courte durée du cycle cellulaire dans les cellules tumorales explique la différence d'effet des poisons du fuseau entre cellules néoplasiques et cellules saines. D'autres mécanismes sont également évoqués comme l'activation des voies conduisant à la mort cellulaire et la voie de dégradation du complexe cycline B- CDK 1 (Gascoigne and Taylor, 2009). Des protéines pro-apoptotiques telles p53 et Bcl-2, sont transportées par les microtubules. Ainsi, en plus de stabiliser les microtubules, le docétaxel peut réguler positivement l'apoptose (voie intrinsèque mitochondriale) (Haldar et al., 1997). Les taxanes régulent positivement l'apoptose en phosphorylant et inhibant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Haldar et al., 1997). Les taxanes activent également les molécules pro-apoptotiques Bax, Bad, et Apaf-1 ainsi que la voie des caspases 2 et 9. La protéine pro-apoptotique BIM est liée aux microtubules, et après traitement par paclitaxel, est transloquée du microtubule à la mitochondrie, induisant l'apoptose (Li et al., 2005). Les lignées cellulaires ayant une plus forte expression de BIM sont ainsi plus sensible à l'apoptose

induite par le paclitaxel.

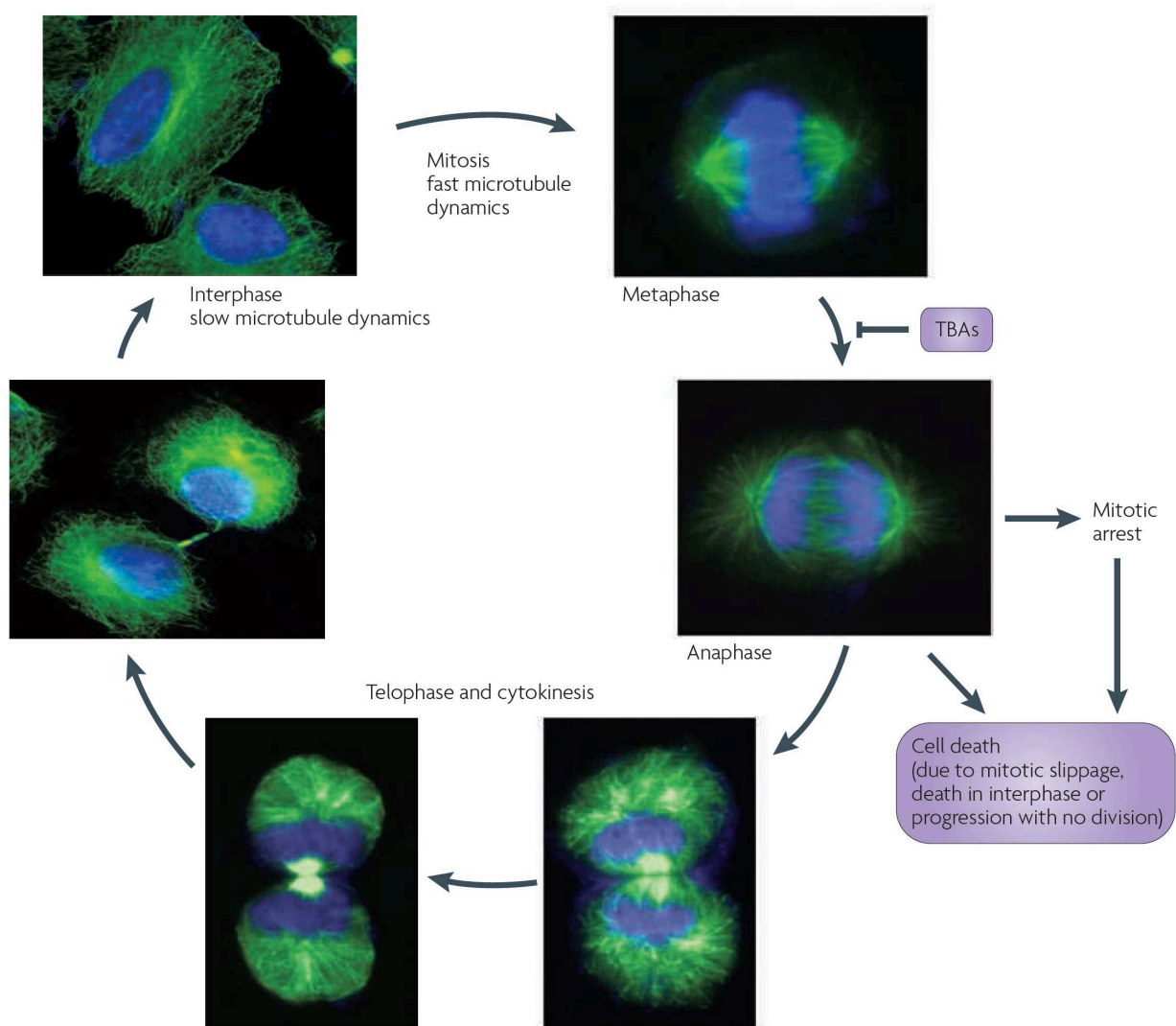


Figure 13. Cycle cellulaire et cible des agents cytotoxiques ciblant les microtubules, à la jonction métaphase-anaphase. Les microtubules (en vert) subissent des changements morphologiques importants à tout au long du cycle cellulaire. La dynamique des microtubules varie au cours du cycle cellulaire, étant la moins dynamique dans les cellules en interphase et la plus dynamique au cours de la mitose ce qui en fait une cible importante pour agents cytotoxiques. La plupart des agents cytotoxiques ciblant les microtubules agissent sur la dynamique des microtubules et entraînent ainsi un arrêt de la mitose, qui peut conduire à la mort cellulaire par le biais de divers mécanismes. L'ADN est représentée en bleu. (D'après Kavallaris, 2010)

Taxanes : paclitaxel et docétaxel

Le paclitaxel (Taxol®, Bristol-Myers Squibb) est naturellement issu du *Taxus brevifolia*. Le

docétaxel (Taxotère®, Sanofi-Aventis) est un analogue semi-synthétique, hydrosoluble, dérivé d'un précurseur isolé du *Taxus baccata*. Leur structure tridimensionnelle est complexe, ils ont en commun une chaîne ester en position 13'. Le docétaxel est déacétylé en 10' avec un groupe triméthyle côté amide, alors que le paclitaxel a un groupe phényle à cet endroit. Les deux molécules se lient à la β -tubuline au même site, qui se situe à la face interne, c'est-à-dire dans la lumière des microtubules.

III. 3. Mécanismes de chimiorésistance

Des mécanismes cellulaires de résistance aux poisons du fuseau sont multiples. L'identification d'un mécanisme particulier pour une drogue particulière utilisé dans le traitement d'un cancer en particulier est difficile. L'étude de ces mécanismes de résistance aux poisons du fuseau dépend en effet de la composition en β -tubuline de la cellule tumorale. Or, comme vu précédemment, l'expression des β -tubulines dans les microtubules est d'expression tissu-dépendante mais est également modifiée dans les cellules tumorales comparativement au tissu sain. Des modèles moléculaires ont été utilisés pour étudier comment l'affinité des poisons du fuseau varie pour chaque isotype de la β -tubuline (**Figure 14**). Par exemple, la vinorelbine se lie à la β -tubuline sur un domaine particulier appelé vinc-binding. La vinblastine se lie directement au microtubule et également à la tubuline soluble. A l'inverse, le paclitaxel diffuse à travers les nanopores jusqu'à atteindre son site de liaison dans la lumière du microtubule. Ce transport est médié par un pont hydrogène qui implique une sérine en position 275 sur la plupart des isotopes de la β -tubuline, sauf les β -tubuline de classe III et VI (Freedman et al., 2009). Cette liaison perturbe une boucle protéique (appelée boucle M) qui stabilise les interactions latérales du microtubule avec les protofilaments.

Cependant, tous les isotopes de la β -tubuline ainsi que leur liaison aux poisons du fuseau n'ont pas été complètement disséqués. Le grand nombre de modifications post-traductionnelles subies par les différents isotopes ajoute également à la complexité de l'étude.

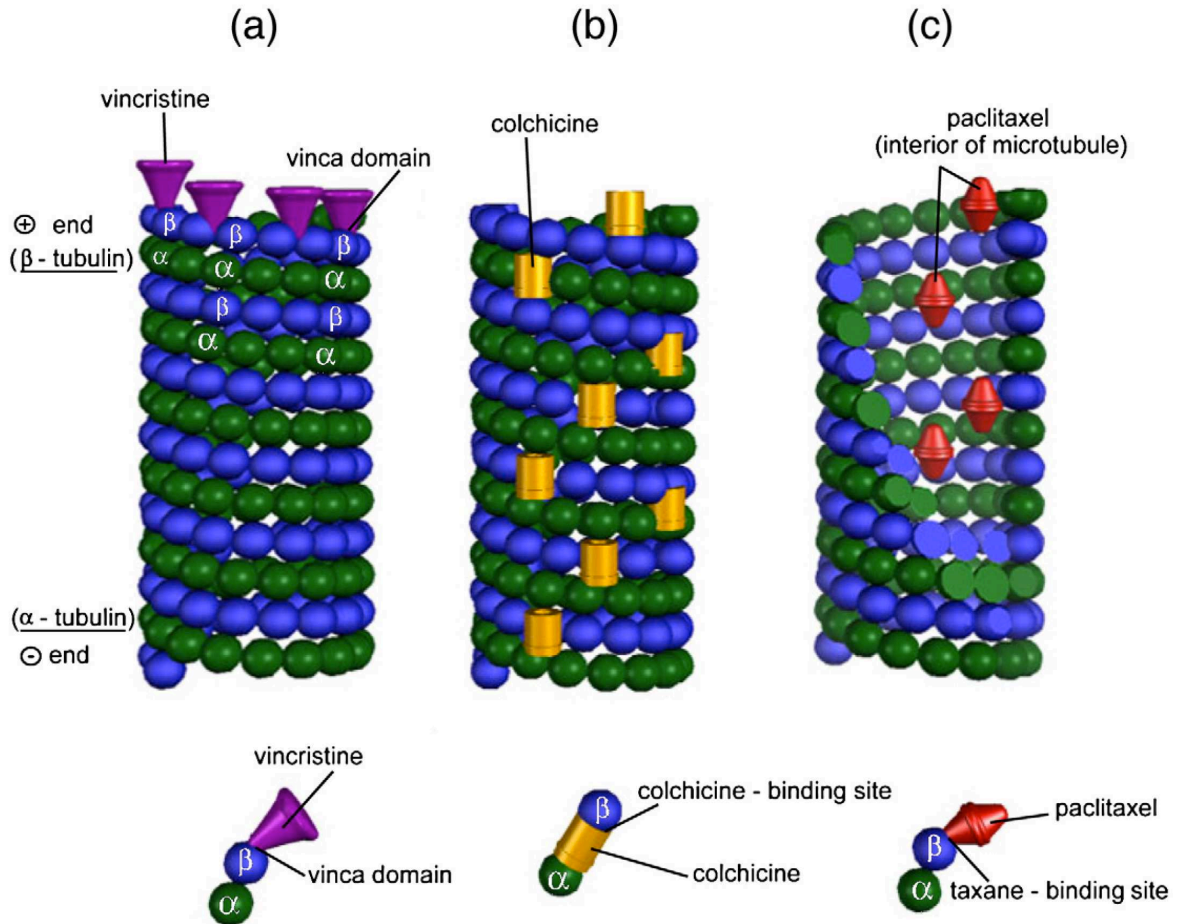


Figure 14. Différents sites de liaison des poisons du fuseau aux microtubules. (a) Par exemple, la vincristine se lie à la β -tubuline sur un domaine particulier appelé vinca-domain. La vinblastine se lie directement au microtubule et également à la tubuline soluble. (c) A l'inverse, le paclitaxel diffuse à travers les nanopores jusqu'à atteindre son site de liaison dans la lumière du microtubule.

Plusieurs mécanismes de résistance des cellules tumorales aux poisons du fuseau, et particulièrement au docétaxel, ont été évoqués, comme la sur-expression du gène ABCB1 codant pour une pompe transmembranaire, des mutations somatiques du gène de la β -tubuline de classe I, ou bien l'augmentation de l'expression de la β III-tubuline (**Figure 15**).

Quelque soient l'expression différentielle des isotypes de la β -tubuline et les modifications post-traductionnelles qui affectent l'action des poisons du fuseau, l'expression aberrante de certains isotypes de la β -tubuline et des MAPs a été fréquemment associée à la résistance de lignées cellulaires et de cellules tumorales aux poisons du fuseau dans la littérature, particulièrement dans les cancers du poumon, de l'ovaire et du sein (Ferrandina et al., 2006 ; Kavallaris et al., 1997 ; Rouzier et al., 2005 ; Tommasi et al., 2007 ; Sève and Dumontet,

2008).

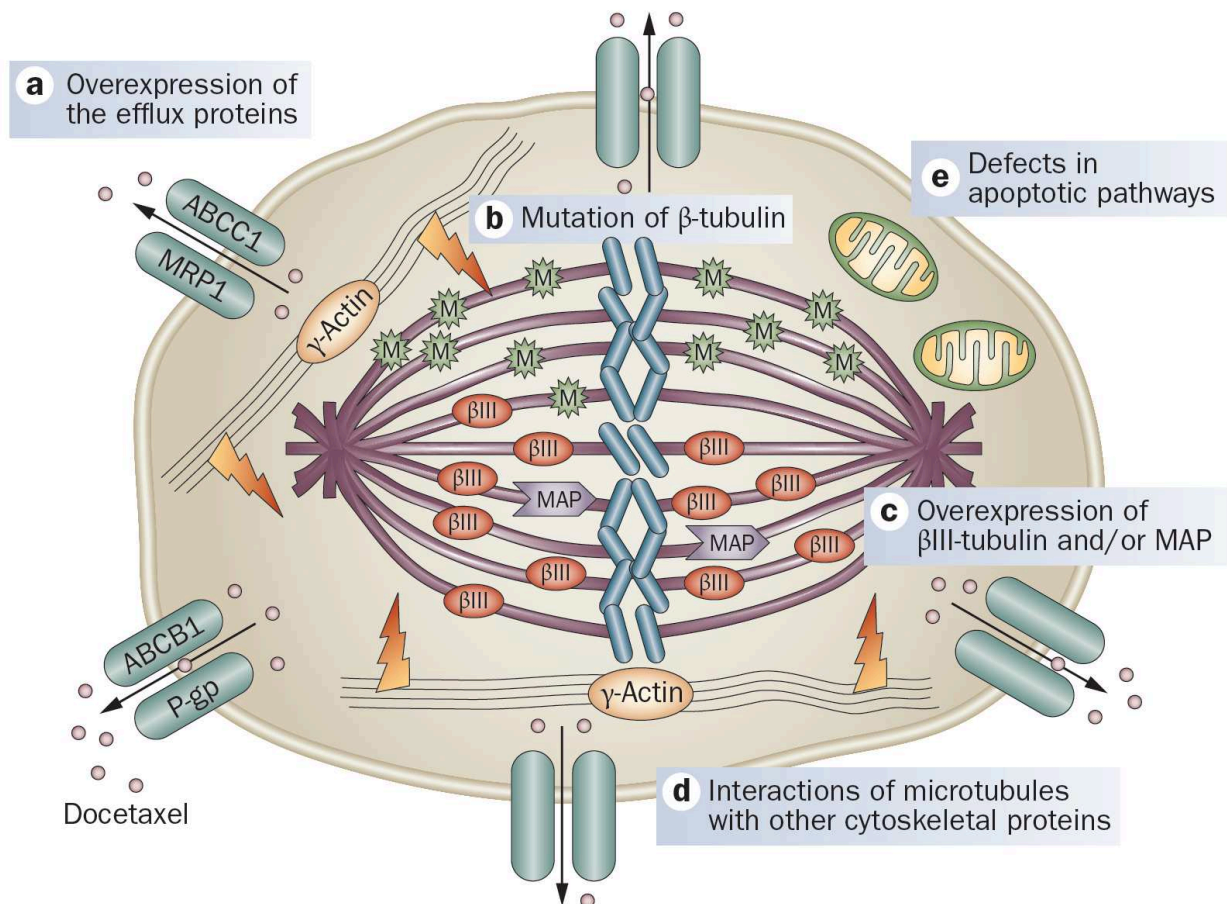


Figure 15. Mécanismes cellulaires de résistance aux taxanes.

(a) surexpression de protéines d'efflux membranaire, tels que transporteurs ABC dont la P-gp ; (b) altération directe de la cible de drogue par mutation ; (c) expression altérée des isotypes de tubuline (par exemple, la surexpression de β III-tubuline) ; (d) changements aux microtubules induite par les interactions avec d'autres protéines du cytosquelette (par exemple, γ -actine) ; (e) défauts d'apoptose; ABC, ATP-binding cassette; MAP, microtubule-associated proteins; MRP1, protéine résistante aux médicaments multiples 1; P-gp, P-glycoprotéine. (D'après Seruga et al., 2011)

III. 3. 1 Sur-expression de la pompe transmembranaire (gène ABCB1)

Un mécanisme de résistance commun à toute chimiothérapie est celui impliquant la pompe efflux transmembranaire P-glycoprotéine (P-gp) codée par le gène de « résistance multidrogue » (gène MDR1). Ce transporteur transmembranaire fonctionne avec un domaine

liant l'ATP (d'où le nom de ABC pour ATP-binding cassette) et est classé en plusieurs groupes : ABCB1 pour ABC de groupe B ; ABCC1 pour ABC de groupe 1. Cette pompe évacue les drogues de la cellule vers le milieu extracellulaire. Elle est sur-exprimée dans de nombreuses lignées cellulaires. La sur-expression de cette pompe génère une diminution de l'accumulation intracellulaire de la drogue cytotoxique, et donc une diminution de l'action de cette drogue (Gottesman et al., 2002). Ce mécanisme de résistance a été prouvé in vitro. En revanche, le rôle du complexe MDR1/Pgp en clinique dans la résistance aux drogues n'a pas été validé à cause du faible nombre d'études sur tissu tumoral ayant testé l'expression P-gp. Dans le cancer du sein, une étude a montré que de forts niveaux d'expression du complexe MDR1/Pgp étaient associés à une moins bonne survie sans récurrence dans une cohorte de patientes naïves de toute chimiothérapie (Tsukamoto et al., 1997). A l'inverse, d'autres études n'ont pas retrouvé d'association entre expression du complexe MDR1/Pgp et réponse aux taxanes (Schneider et al., 1995 ; Kanzaki et al., 2001). Dans le cancer du poumon, une étude a corrélé positivement absence d'expression du complexe MDR1/Pgp et réponse au paclitaxel (Yeh et al., 2003). Dans le cancer de l'ovaire, la sur-expression du complexe MDR1/Pgp a été rapportée comme facteur prédictif de survie et de réponse au paclitaxel (Penson et al., 2004). Un inhibiteur de P-gp, le zosuquidar, a été évalué dans des études de phase I avec un effet modéré sur les concentrations plasmatiques de docétaxel (Fracasso et al., 2004). Cependant, à l'heure actuelle, les inhibiteurs de P-gp ont démontré peu d'impact clinique sur la re-sensibilisation des tumeurs aux poisons du fuseau, au prix d'effets secondaires importants (Pusztai et al., 2005).

III. 3. 2 Inhibition des voies de l'apoptose (p53, Bcl-2, BIM)

En plus de stabiliser les microtubules, les taxanes régulent positivement l'apoptose en phosphorylant et inhibant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Haldar et al., 1997). Les taxanes activent également les molécules pro-apoptotiques Bax, Bad, et Apaf-1 ainsi que la voie des caspases 2 et 9. Une perturbation de ces voies, en aval de l'action de stabilisation/déstabilisation du poison du fuseau, peut générer une chimiorésistance, par un effet anti-apoptotique direct.

Ces deux premiers mécanismes sont retrouvés comme mécanismes de résistance à d'autres drogues cytotoxiques, autres que poisons du fuseau, notamment à la mitoxantrone, utilisée jusqu'en 2004 dans le traitement du CaP résistant à la castration.

III. 3. 3 Mutations somatiques du gène de la β -tubuline de classe I

Des mutations des gènes β -tubuline peuvent modifier les sites de liaison ou la configuration tridimensionnelle de la protéine, et ainsi perturber l'affinité β -tubuline/poison du fuseau. Les principales mutations ont été décrites pour l'isotype β -tubuline de classe I à partir de lignées cellulaires résistantes aux poisons du fuseau (Pasquier et al., 2008). Monzo et al ont démontré que les mutations de la β -tubuline de classe I était présente dans un tiers des cancers du poumon à petites cellules avant traitement et que la présence de cette mutation était significativement associée à la sensibilité au paclitaxel (Monzo et al., 1999). Ces constatations n'ont cependant pas été confirmées (Sève and Dumontet, 2005). Des analyses de cellules de cancer de l'ovaire résistantes au paclitaxel ont montré des mutations du gène de la β -tubuline de classe I (Giannakakou et al., 1997).

Ainsi, à l'heure actuelle, on ne sait pas si de telles mutations ont un réel impact clinique parmi les patients traités par poison du fuseau, et ces mutations semblent finalement rarement retrouvées dans les études cliniques (Berrieman et al., 2004).

Un autre mécanisme de résistance potentiel concernant la β -tubuline de classe I pourrait être le polymorphisme génique. Dans une étude évaluant des échantillons tumoraux (avant et après traitement par paclitaxel) de cancers de l'ovaire et du poumon, aucune mutation de la β -tubuline de classe I n'a été retrouvée. En revanche, des polymorphismes de l'exon 1 du gène étaient détectés à une faible fréquence (Sale et al., 2002).

III. 3. 4 Rôle des MAPs

Les protéines associées aux microtubules (MAPs), comme tau, MAP2 ou MAP4, se lie aux microtubules et les stabilisent contre la dépolymérisation (*Figure 12*). Une augmentation de leur expression a été associée à une résistance accrue aux poisons du fuseau.

-**Tau** et **MAP2** sont exprimés principalement dans les cellules neuronales. Une forte expression de la protéine tau a été corrélée à une moins réponse au paclitaxel dans le cancer du sein (Rouzier et al., 2005 ; Tanaka et al., 2009). Son action bloquerait l'accès à la lumière du microtubule pour la molécule de taxane. Dans une étude de phase II évaluant l'effet néoadjuvant d'une épothilone, l'ixabepilone, dans le cancer du sein, le niveau d'expression de tau était un facteur prédictif de réponse à cette chimiothérapie (Baselga et al, 2009). La sous-expression de MAP2c, un variant d'épissage de MAP2, a été associée à la résistance aux poisons du fuseau dans des cellules de neuroblastome sélectionnées par un traitement par vincristine (Don et al., 2004). Comparativement aux variants MAPa et b, MAPc est un faible

promoteur de polymérisation, et sa sous-expression au dépend des autres isoformes favorise la stabilité des microtubules et donc contrebalance l'effet déstabilisant des vinca-alcaloïdes.

-**MAP4** est la principale MAP non neuronale, et son expression peut être régulée par le gène suppresseur de tumeur p53 (Murphy et al., 1996). L'induction de p53 génère une répression de MAP4 et réduit ainsi la sensibilité de la cellule au paclitaxel. En revanche, cela augmente la sensibilité à la vinblastine, probablement à cause de l'instabilité du microtubule induite par la répression de MAP4 (Zhang et al., 1999).

-La **stathmine** est une phosphoprotéine cytosolique qui participe à la régulation du fuseau mitotique en se liant aux hétérodimères de tubuline et en induisant une dépolymérisation des microtubules (*Figure 12*). La stathmine est fortement exprimée dans les hémopathies malignes et plusieurs cancers (Rana et al., 2008). Une inhibition de la stathmine sensibilise les cellules tumorales aux poisons du fuseau et inhibe la tumorigénicité des cellules leucémiques *in vivo* (Belletti et al., 2008 ; Rana et al., 2008). Des auteurs ont démontré qu'une sur-expression de stathmine diminuait la sensibilité au paclitaxel et à la vinblastine des cellules de cancer du sein (Alli et al., 2007). De même, elle a été associée à un pronostic plus mauvais dans une cohorte de patientes atteintes de cancers de l'ovaire traitées par paclitaxel et cisplatine (Su et al., 2009). Un des mécanismes d'action pourrait être l'augmentation de la liaison tubuline/poison du fuseau (Devred et al., 2008).

III. 3. 5 Altération du cytosquelette

De récentes études de protéomique ont mis en lumière le rôle potentiel du cytosquelette d'actine dans la sensibilité et résistance des cellules aux poisons du fuseau. Des interactions importantes existent entre tubulines et actines et le rôle de ses interactions dans le cancer est prouvé (Rodriguez et al., 2003 ; Hall, 2009). Une des protéines d'intérêt est l' γ -actine, qui est exprimée à de faibles niveaux dans les leucémies et est impliquée dans la résistance intrinsèque et acquise de ces cellules à la vincristine. Une baisse de son expression ou des mutations de l' γ -actine induisent une résistance aux poisons du fuseau (Verrills et al., 2006). Les mécanismes exacts de cette résistance induite par l' γ -actine restent peu connus.

Les protéines régulatrices du cytosquelette d'actine ont également été impliquées dans la résistance aux poisons du fuseau. Des analyses par puce au sein de 39 lignées cellulaires de cancer ont identifiées la IIM kinase 2 (IIMK2) comme marqueur prédictif de résistance à de nombreuses drogues (Dan et al., 2002). L'extinction de l'expression de IIMK2 par approche

siARN augmentait la sensibilité des cellules de neuroblastome aux vinca-alcaloïdes (Po'uha et al., Oncogene 2010). D'autres protéines, comme le TGFβI peut induire la stabilisation des microtubules et sensibiliser les cellules au paclitaxel (Ahmed et al., 2007).

III. 3. 6 Sur-expression des isotypes de la β-tubuline

L'expression aberrante de certains isotypes de la β-tubuline a été fréquemment associée à la résistance de lignées cellulaires et de cellules tumorales aux poisons du fuseau dans la littérature.

- La baisse d'expression de la β-tubuline de classe II a été associée à des cancers de l'ovaire plus agressifs ayant une plus faible survie sans progression (Ohishi et al., 2007). Dans les cancers du sein, une augmentation de son expression a été corrélée à la résistance à la chimiothérapie par docétaxel (Bernard-Marty et al., 2002).

- De forts niveaux d'expression de la β-tubuline de classe III ont été associés à des cancers plus agressifs et des cancers résistants aux poisons du fuseau dans de nombreux types de néoplasies particulièrement dans les cancers du poumon, de l'ovaire et du sein (Ferrandina et al., 2006 ; Kavallaris et al., 1997 ; Tommasi et al., 2007 ; Sève and Dumontet, 2008). Le rôle de la sur-expression de la β-tubuline de classe III dans le chimiorésistance sera discuté dans le paragraphe suivant.

III.4. β-tubuline de classe III (βIII-tubuline) et impact de sa sur-expression dans les tissus cancéreux sur la chimiorésistance

III.4.1 Données *in labo*, mécanismes de résistance dans les lignées cellulaires

La β-tubuline de classe III (βIII-tubuline) est exprimée de façon préférentielle dans le tissu nerveux, dans les cellules neuro-endocrines, et a été associée à la différenciation neuro-endocrine (Katsetos et al., 2000 and 2003). Elle est également exprimée dans les mélanocytes, dérivés de la crête neurale (Akasaka et al., 2009). Dans le tissu cancéreux, son expression a été mise en évidence dans plusieurs types de cancers, en immunohistochimie dans le tissu tumoral ou au sein des lignées cellulaires, essentiellement les cancers de l'ovaire, du sein et du poumon non à petites cellules (Galmarini et al., 2008 ; Ferrandina et al., 2006 ; Sève et al., 2005).

La littérature sur le rôle de la βIII-tubuline dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques

ciblant les microtubules (taxanes, vinca-alcaloïdes) est abondante. Nous rapporterons ici une partie des études associant la sur-expression de β III-tubuline et la résistance aux poisons du fuseau.

Liu et al ont démontré que la sélection de lignées cellulaires de cancer du pancréas par un traitement par docétaxel générait une augmentation de l'expression de la β III-tubuline (Liu et al., 2001).

Dans des lignées cellulaires de mélanome, l'expression de la β III-tubuline a été corrélée à la sensibilité des cellules au docétaxel. L'extinction de son expression induisait l'apparition d'une chimiorésistance au paclitaxel et au docétaxel (Mhaidat et al., 2008 ; Akasaka et al., 2009).

En sur-exprimant la β III-tubuline dans des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire (lignée CHO), Hari et al ont induit une résistance au paclitaxel (Hari, 2003). L'approche fonctionnelle opposée par l'extinction de la β III-tubuline sensibilisait à l'inverse les cellules au paclitaxel (Kavallaris et al., 1999). Des constatations identiques ont été observées dans le cancer du poumon (Gan et al., 2007). Cette restauration de la sensibilité pouvait n'apparaître que partiellement, soulignant des mécanismes multifactoriels de résistance à la chimiothérapie impliquant des altérations d'autres isotypes de la tubuline, comme des mutations de ces tubulines ou bien l'augmentation de l'expression des MAPs (Martello et al., 2003). Mozetti et al ont cependant montré que la sur-expression de la β III-tubuline était le mécanisme de résistance prépondérant dans les cellules de cancer de l'ovaire, comparativement aux mutations de la β I-tubuline et à l'augmentation d'expression de la pompe transmembranaire MDR-1 (Mozzetti et al., 2005).

Les mécanismes moléculaires de chimio-résistance associés à la sur-expression de la β III-tubuline ont été largement étudiés mais restent débattus (Sève et al., 2008 ; Monzo et al., 1999 ; Giannakakou et al., 1997 ; Horwitz et al., 1986).

- Modification de la dynamique du microtubule

Une hypothèse évoquée est la modification de liaison entre taxane et β -tubuline selon son isotype, générant une modification de l'effet de stabilisation latérale au cours de la polymérisation (Nogales et al., 1999). Les microtubules composés de β III-tubuline ont ainsi une dynamique augmentée avec un taux d'échange de dimères de tubulines rapide aux extrémités du microtubule (Panda et al., 1994).

Le site de liaison du paclitaxel sur la β -tubuline a ainsi été identifié. Une arginine remplace une sérine en position 277 dans la β III-tubuline, comparativement à la β I-tubuline, réduisant ainsi l'affinité de liaison avec les taxanes (Magnani et al., 2006). Les microtubules composés uniquement de β III-tubuline nécessitent une concentration plus forte de paclitaxel pour que celui génère un effet stabilisant (Derry et al., 1997).

Les données *in vitro* ont montré que les dimères d' $\alpha\beta$ III étaient moins sensibles à l'action des taxanes que les dimères $\alpha\beta$ II, $\alpha\beta$ III, et $\alpha\beta$ IV (Hari, 2003 ; Derry et al., 1997 ; Lu and Luduena, 1993 ; Barnajee et al, 1990). Des approches fonctionnelles par sur-expression ou extinction de la β III-tubuline allaient dans le sens de ces observations (Kamath et al., 2005 ; Kavallaris et al., 1999). Certains avancent l'hypothèse que la dynamique intrinsèque des dimères $\alpha\beta$ dans les cellules tumorales, qui sur-expriment la β III-tubuline, est différente et expliqueraient la baisse de la sensibilité aux poisons du fuseau (Lu and Luduena, 1993 ; Banerjee et al., 1990). La β III-tubuline diminue le taux de polymérisation des microtubules réduisant ainsi l'action stabilisante et polymérisante des taxanes. En utilisant une approche fonctionnelle antisens, Kamath et al ont montré que la sur-expression de la β III-tubuline induisait une résistance au paclitaxel en limitant la capacité de cette molécule à modifier la dynamique du microtubule. Ils ont ainsi montré que l'instabilité était moins perturbée dans les cellules sur-exprimant la β III-tubuline comparativement aux cellules sur-exprimant la β I-tubuline en cas de traitement par paclitaxel, alors que cette différence de résistance n'était pas retrouvée en l'absence de paclitaxel dans le milieu (Kamath et al., 2005).

- Rôle dans l'apoptose : la β III-tubuline comme facteur de survie cellulaire

Ce rôle de la β III-tubuline sur la dynamique du microtubule reste toutefois débattu. Dans des lignées cellulaires de cancer du poumon, l'extinction de l'expression de la β III-tubuline n'affectait pas la dynamique des microtubules (Gan et al., 2007). En revanche, cette perte d'expression augmentait le niveau d'apoptose parmi les cellules traitées par de faibles concentrations de vincristine ou paclitaxel, sans lien avec un arrêt du cycle cellulaire. A de plus fortes concentrations de drogues, à la fois la mort cellulaire par apoptose et par arrêt du cycle cellulaire était observée suggérant que l'extinction de la β III-tubuline augmentait l'action des poisons du fuseau par deux mécanismes distincts : suppression de la dynamique des microtubules et mort cellulaire par apoptose.

La β III-tubuline pourrait ainsi agir comme facteur de survie cellulaire, et donc de facteur de résistance à la chimiothérapie. Des études ont montré que l'expression de la β III-tubuline était induite dans des situations de stress cellulaire comme l'hypoxie ou la privation en glucose

(Katsetos et al., 2009). Des analyses du promoteur du gène *Tubb3* chez le rat et dans des lignées cellulaires de cancer de l'ovaire ont révélé un site de fixation de HIF1 α ., facteur de transcription important dans les situations d'hypoxie (Raspaglio et al., 2008).

Récemment, Cochrane et al ont montré qu'un micro-ARN (miR-200c), connu pour être associé à la répression du facteur de transcription ZEB1, ciblait également le gène de la β III-tubuline (Cochrane et al, 2009). Dans cette étude, la transfection de miR-200c dans des lignées cellulaires de cancer endométrial permettait de restaurer la sensibilité des cellules au paclitaxel. Les auteurs évoquaient l'idée d'une application clinique directe d'une telle thérapie.

III.4. 2 Données cliniques, association entre expression de la β III-tubuline et pronostic

Comme vu précédemment, de forts niveaux d'expression de la β -tubuline de classe III ont été associés à de nombreux types de néoplasies particulièrement dans les cancers du poumon, de l'ovaire et du sein (Ferrandina et al., 2006 ; Kavallaris et al., 1997 ; Tommasi et al., 2007 ; Séve and Dumontet, 2008). Le lien entre sur-expression de la β III-tubuline et résistance aux poisons du fuseau d'après les données *in vitro* ont amené de nombreux auteurs à tester ce lien dans des cohortes de patients. Les principales publications concernent les cancers gynécologiques (sein, ovaire) et les cancers du poumon non à petites cellules.

D'autres études cliniques ont été conduites dans les carcinomes de primitif inconnu, dans les cancers ORL, dans les cancers du pancréas et de l'estomac.

L'étude de l'expression de la β III-tubuline a été principalement effectuée par immunohistochimie (IHC), mais également par RT-PCR dans quelques études. Pour les études d'IHC, le seuil de positivité pour définir une sur-expression de la β III-tubuline variait selon les séries : 10% de cellules marquées, 50%, médiane.

Toutes les conclusions convergeaient vers une association clinique entre expression de β III-tubuline et résistance aux poisons du fuseau, et particulièrement aux taxanes.

Dans le cancer du poumon non à petites cellules, du sein, de l'ovaire, de l'estomac et dans les carcinomes de primitif inconnu, une forte expression de la β III-tubuline apparaissait comme facteur prédictif de réponse et a été significativement associée à une plus mauvaise survie sans progression et/ou globale chez les patients traités par une chimiothérapie par taxanes

(Galmarini et al., 2008 ; Ferrandina et al., 2006; Ohishi et al., 2007 ; Urano et al., 2006 ; Sève et al., 2005b ; Paradiso et al., 2005). Indépendamment d'un traitement par taxanes, l'expression tissulaire de la β III-tubuline sur les pièces opératoires a également été associée au pronostic des patients (bras placebo d'un essai prospectif randomisé de chimiothérapie adjuvante dans le cancer du poumon), en termes de survie globale et de survie sans récurrence (Sève et al., 2007).

Les principales séries sont listées dans le tableau suivant (*Tableau 6*).

<i>Cancer</i>	<i>Série</i>	<i>Technique</i>	<i>Drogues</i>	<i>Effet de la sur-expression de βIII-tubuline</i>
Sein	Hasegawa, 2003	RT-PCR	Paclitaxel	Taux de réponse
	Paradiso, 2005	IHC	Paclitaxel	Taux de réponse
	Tommasi, 2007	IHC	Paclitaxel	Taux de réponse
Poumon	Rosell, 2003	RT-PCR	Paclitaxel	Taux de réponse
	Dumontet, 2005	IHC	Taxane	Taux de réponse
	Sève, 2005	IHC	Taxane	Baisse survie sans récurrence
	Sève, 2005	IHC	Vinorelbine	Baisse survie sans récurrence Taux de réponse
Ovaire	Kavallaris, 1997	RT-PCR	Paclitaxel	Taux de réponse
	Mozetti, 2005	RT-PCR	Paclitaxel	Taux de réponse
	Ferrandina, 2007	IHC	Paclitaxel	Baisse survie globale
Primitif inconnu	Sève, 2007	IHC	Paclitaxel	Taux de réponse
				Baisse survie globale
ORL	Koh, 2009	IHC	Cisplatine	Baisse survie sans récurrence
Pancréas	Lee, 2007	IHC	N/A	Cancers plus agressifs
Estomac	Urano, 2006	IHC	Paclitaxel	Taux de réponse
Côlon	Portyanko, 2009	IHC	N/A	Invasion des marges

Tableau 6. Principales séries cliniques ayant étudié l'association entre expression tissulaire de la β III-tubuline et la réponse clinique à la chimiothérapie par poisons du fuseau ou autre chimiothérapie.

D'autres néoplasies ont été étudiées. Parmi les cancers de l'ovaire, un type pathologique rare en Europe mais fréquent au Japon (20% des cancers de l'ovaire), les adénocarcinomes à cellules claires, a été testé (Aoki et al., 2009). A l'inverse des carcinomes ovariens classiques, l'expression de la β III-tubuline était positivement corrélée à la survie globale chez les patientes traitées par taxanes.

De façon intéressante, l'expression de la β III-tubuline a été associée aux tumeurs bien différenciées à faible prolifération, et donc de bon pronostic, dans les tumeurs d'origine neuronale (médulloblastome, neuroblastome, rétinoblastome). La β III-tubuline est en effet exprimée de façon préférentielle dans le tissu nerveux, dans les cellules neuro-endocrines, et a

été associée à la différenciation neuro-endocrine (Katsetos et al., 2000 and 2003).

III.4.3 β III-tubuline et cancer de prostate

Malgré ces données, l'expression de la β III-tubuline dans le cancer de prostate reste actuellement peu étudiée. Au début de ce travail de thèse, une seule étude clinique a montré la présence d'une expression de la β III-tubuline en immunohistochimie dans une petite cohorte de cancers de prostate (Ranganathan et al., 1997). Ranganathan et al ont étudié l'expression isotypique de la β -tubuline dans 26 pièces de prostatectomie. Ils ont retrouvé l'isotype IV comme étant le plus fréquemment exprimé dans le tissu prostatique bénin et cancéreux. L'expression de la β III-tubuline leur apparaissait faible dans le tissu cancéreux (Ranganathan et al., 1997).

Au cours de ce travail de thèse, une série de 289 pièces de prostatectomies totales (sur TMA) a été publiée, étudiant la positivité du CaP pour la β III-tubuline en IHC (Egevad et al., 2010). La positivité en β III-tubuline n'a été retrouvée que dans les cellules tumorales, et non dans les cellules saines, et dans un pourcentage relativement faible : 11.6% des CaP seulement était positifs. L'expression de la β III-tubuline a été associée aux cancers agressifs de score de Gleason élevé, aux atteintes ganglionnaires, et était un facteur prédictif indépendant de récurrence biologique après chirurgie. Au moment de la publication de cette étude, nos données sur tissu hormono-naïf corroboraient ces constatations.

Peu d'études *in vitro* existaient dans le cancer de prostate, toutes conduites par la même équipe sur une lignée cellulaire, DU 145. Des données encourageantes retrouvaient une augmentation des niveaux de β III-tubuline, à la fois au niveau du transcrite et de la protéine, lorsque les cellules étaient cultivées dans un milieu contenant du paclitaxel (Ranganathan et al., 1998a and 1998b). Après sélection de cellules DU145 par une exposition prolongée au paclitaxel, l'augmentation de l'expression de la β III-tubuline était observée sans modification du niveau d'expression de l'isotype β IVb. De façon intéressante, l'étude de l'expression de MDR1 était négative dans les cellules parentales et les cellules sélectionnées par paclitaxel. Ces résultats impliquent que la sur-expression de P-gp n'était pas le mécanisme de résistance principal du paclitaxel dans cette lignée de CaP.

Cependant, malgré l'augmentation d'expression de la β III-tubuline en réponse au paclitaxel, Ranganathan et al n'ont pas réussi à mettre en évidence de résistance au paclitaxel induite par

la sur-expression de la β III-tubuline, par une transfection de son ADNc dans la lignée DU 145 (Ranganathan et al., 2001). Pour expliquer leurs résultats, les auteurs rapportaient une augmentation concomitante des isotypes β II et β IVb après transfection, contrebalançant les effets de la sur-expression de la β III-tubuline. Leurs résultats de l'analyse en Western-blot montraient cependant une différence d'expression faible de la β III-tubuline entre lignée parentale et lignée transfectée pouvant expliquer en partie l'absence de différence des deux lignes concernant leur sensibilité au paclitaxel. En effet, les DU 145 sont des cellules androgéno-indépendantes exprimant à l'état parental la β III-tubuline, comme nous le verrons au cours de cette thèse. D'autres lignées cellulaires hormonosensibles et sans expression basale de β III-tubuline seraient de meilleures cibles d'étude.

Ces études utilisaient le paclitaxel et ont été conduites dans les années 1990, c'est-à-dire avant l'avènement du docétaxel comme chimiothérapie de référence dans le CaP résistant à la castration. D'autres expériences comparant tissu hormono-naïf et résistant à la castration, évaluant le rôle de la β III-tubuline dans la résistance au docétaxel sur d'autres lignées cellulaires, nous sont apparues intéressantes.

Objectifs du projet de recherche sur la β -tubuline de classe III (β III-tubuline)

Les travaux entrepris au cours de cette thèse ont eu pour but d'étudier l'expression de la β III-tubuline et son impact pronostique/prédictif dans l'histoire naturelle du cancer de prostate chez l'homme. Les travaux de recherche ont été conduits, sur des modèles *in vitro*, *in vivo* et sur tissus tumoraux, pour répondre à 4 questions principales :

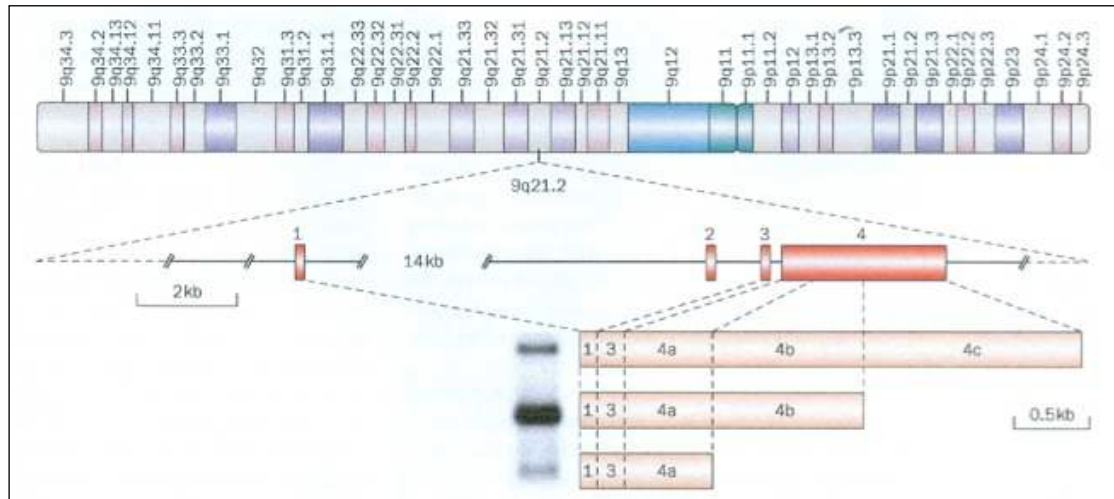
- 1- Quelle est l'expression de la β III-tubuline dans le tissu prostatique tumoral et non néoplasique ?
- 2- Son expression au sein du tissu cancéreux hormono-naïf est-elle corrélée aux facteurs pronostiques et à la récurrence biologique après chirurgie ?
- 3- Son expression est-elle modulée par la suppression des androgènes ?
- 4- Son expression est-elle modulée par la chimiothérapie par docétaxel et est-elle un mécanisme de résistance au docétaxel dans le cancer de prostate ?

IV. Gène PCA3 et score urinaire dérivé : généralités, intérêt diagnostique et pronostique

IV. 1. Généralités

En 1999, un nouveau gène spécifique du tissu prostatique a été mis en évidence, utilisant une expression différentielle entre le tissu tumoral et le tissu sain adjacent, au sein d'une pièce de prostatectomie totale (Bussemakers, et al. 1999). Il a été montré que ce gène : DD3 (differential display clone 3) est très surexprimé par le tissu tumoral prostatique par rapport au tissu sain chez un même patient (66 fois en moyenne). Ce gène a été nommé PCA3, du fait de son association au cancer de prostate. Une faible expression de PCA3 a été retrouvée dans le tissu prostatique normal ou le tissu d'hypertrophie bénigne ainsi qu'une très forte sur expression dans 95% des tissus tumoraux prostatiques (de Kok et al., 2002). En utilisant une technique de RT-PCR, il a été démontré que l'expression de PCA3 est nulle au sein d'autres tissus de l'organisme ainsi que dans des tissus tumoraux issus d'autres organes (sein, col, endomètre, testicule) ou de lignées cellulaires tumorales de vessie, rein, ou ovaire (Hessels et al., 2003). Le gène codant PCA3 se situe en 9q21-22 et comprend 4 exons (**Figure 16**). La structure génomique et en particulier multiplicité des codons stop indique que PCA3 n'encode pour aucune protéine et se comporte comme un ARN non codant (Gils et al., 2007).

Figure 16. Structure du transcript PCA3. Le gène codant se situe sur le chromosome 9q 21-22 et comprend 4 exons. La polyadénylation altrnative à 3 sites différents de l'exon 4 donne lieu à 3 transcripts de taille différentes. Les plus fréquents comportent les exons 1, 3, 4a, 4b.



La forte association de PCA3 au cancer de prostate en a fait un candidat naturel au statut de biomarqueur du carcinome prostatique. Néanmoins, l'absence de protéine produite a conduit de fait au développement de tests moléculaires en charge de la détection et la mesure d'ARNm, beaucoup plus astringents, compte tenu de la fragilité de ces acides nucléiques, en particulier au sein des fluides biologiques.

En 2002, une technique de RT-PCR en temps réel a été développée, puis une RT PCR quantitative très sensible l'année suivante qui ont confirmé la surexpression de PCA3 exclusivement dans le cancer prostatique (de Kok et al., 2002). Les premiers résultats cliniques concernant la sensibilité et la spécificité de ce marqueur pour la détection du cancer de prostate, furent particulièrement encourageants. Ces techniques furent appliquées au sédiment urinaire du premier jet émis, après massage prostatique. Le rationnel en était que le massage mobilise des cellules prostatiques vers les canaux excréteurs, le premier jet urinaire concentre le plus de sécrétions urétrales et prostatiques, plus de cellules et donc plus d'ARNm d'intérêt. Pour autant, ces urines contiennent également des cellules urothéliales, et des cellules non tumorales. C'est pourquoi l'expression de PCA3 (nombre de copies d'ARNm) est rapportée, normalisée, à l'expression de PSA (nombre de copie d'ARNm) qui reflète la quantité de cellules prostatiques présente dans le milieu. L'expression tissulaire de PSA n'est pas augmentée dans le cancer de prostate et de ce fait est un marqueur de quantité de cellules prostatiques (Meng et al., 2002).

Le score urinaire PCA3 est donc un ratio entre le nombre de copies d'ARNm PCA3 et le nombre de copies d'ARNm PSA, dans un échantillon urinaire (centrifugé ou pas), donné.

Pour sensible et efficace qu'elle soit, cette technique de RT PCR est chronophage et trop intensive pour une utilisation à grande échelle, en dehors des laboratoires de recherche. Une standardisation des conditions de dosage et de recueil des échantillons ont conduit au développement par d'une technique innovante d'amplification médiée par le transcrit (TMA transcription mediated amplification).

En France, ce test est disponible dans 2 laboratoires *Biomnis* (www.biomnis.com) à Ivry sur Seine et *Pasteur Cerba* à Cergy (www.pasteur-cerba.com). Une plateforme TMA Gene probe est également en place dans les laboratoires de recherche du CHU Tenon à Paris et du CHU Mondor, à Créteil où les manipulations de cette étude ont été réalisées. Une étude médico économique est actuellement en cours, le test est actuellement facturé à 300 euros.

IV. 2. Intérêt diagnostique prouvé : prédiction de la positivité des biopsies prostatiques

Six études prospectives mono ou multicentriques publient les résultats de l'utilisation du test urinaire PCA3 chez des patients subissant des biopsies prostatiques en raison d'une élévation du PSA (seuil de 2.5 à 4 ng/ml) et/ou d'une anomalie au toucher rectal (Hessels et al., 2004 ; Tinzi et al., 2004 ; Deras et al., 2008 ; Fradet et al., 2004 ; van Gils et al., 2007 ; de la Taille et al. 2011) (**Tableau 6**). La sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives et l'aire sous la courbe ROC (AUC) étaient calculées en fonction de la positivité ou de la négativité du résultat histologique, et comparées aux résultats du simple dosage sérique du PSA. La valeur seuil de 35 semble être la plus discriminante. Les résultats de ces études attestent de la supériorité du score PCA3 sur le dosage du PSA (total et/ou libre) en termes de valeur prédictive (positive ou négative) et de spécificité, au détriment d'une sensibilité un peu inférieure. Les performances du score PCA3 persistent quelque soit le taux de PSA (inférieur à 4, de 4 à 10, supérieur à 10 ng/ml) ou le volume prostatique (Tinzi et al., 2004 ; Deras et al., 2008). Le score PCA3 apporte donc une valeur diagnostique indépendante du PSA.

<i>Références</i>	<i>Nombre patients</i>	<i>Taux de cancer détectés(%)</i>	<i>Sensibilité (%)</i>	<i>Spécificité (%)</i>	<i>VPP (%)</i>	<i>VPN (%)</i>	<i>AUC PCA3</i>
Hessels et al.	108	22	67	83	53	90	0.72
Tinzl et al.	201	39	82	76	69	87	0.87
Fradet et al.	517	34	66	89	75	83	0.86
van Gils et al.	583	33	65	66	48	80	0.66
Deras et al.	570	36	54	74	54	74	0.69
De la Taille et al.	516	40	64	76			

<i>Références</i>	<i>Nombre patients</i>	<i>Taux de cancer détectés (%)</i>	<i>Sensibilité (%)</i>	<i>Spécificité (%)</i>	<i>VPP (%)</i>	<i>VPN (%)</i>	<i>AUC PCA3</i>
Marks et al.	233	27	58	72	43	83	0.68
Haese et al.	463	28	47	72	39	78	0.66

Tableau 6. Résultats en termes de sensibilité, spécificité et valeurs prédictives du score urinaire PCA3 pour la prédiction des biopsies positives : séries incluant patients subissant une première série de biopsies (Tableau supérieur) ou une deuxième/troisième série de biopsies (Tableau inférieur).

Deux études prospectives multicentriques ont étudié l'apport diagnostique du test PCA3 chez des patients ayant eu précédemment 1 ou 2 séries de biopsies prostatiques négatives (Marks et al, 2007 ; Haese et al., 2008) (**Tableau 6**). Les résultats confirment le gain diagnostique du test, notamment grâce à une meilleure valeur prédictive négative comparée au dosage du PSA et au rapport PSAlibre/PSAtotal. Plus ce score est élevé, plus le risque de cancer est élevé. Le score PCA3 était également indépendant du dosage du PSA total, du rapport PSA libre/total, de l'âge, du volume prostatique et du nombre de biopsies précédentes permettrait en cas de faible score, d'éviter aux patients de nouvelles biopsies (Ploussard et al., 2010c) (**Figure 17**). Cette valeur prédictive indépendante permet de l'intégrer dans les nomogrammes de calcul de risque de CaP. L'ajout du score PCA3 permet ainsi un gain de 5% dans la prédiction de ce

risque (Chun et al., 2009). Ce nomogramme intégrant le PCA3 aux variables classiques a été depuis validé de façon externe (Auprich et al., 2010).

L'avenir du diagnostic et de la caractérisation du cancer de prostate réside sans doute également dans l'association de biomarqueurs. A cet égard, l'association entre les gènes de fusion TMPRSS2-ERG et PCA3 a montré une amélioration de sensibilité de 62% (PCA3 seul) à 73%, sans compromettre la bonne spécificité pour le diagnostic de CaP (plus de 90%) (Hessels et al., 2007). La recherche de transcripts de fusion jouit d'une meilleure spécificité, le score urinaire PCA3 d'une meilleure sensibilité (Salami et al., 2011). Dans une analyse multiplexe Laxman et al. ont réalisé par PCR quantitative, après une amplification de l'ensemble du transcriptome issu de l'urine de 257 patients, incluant 152 patients atteints d'un carcinome prostatique et 105 ayant des biopsies de prostate négatives. Sept biomarqueurs d'ARNm ont été évalués (AMACR, ERG, GOLM1, PCA3, SPINK1, TFF3, TMPRSS2-ERG). En analyse uni et multivariée, l'expression des transcrits de GOLM1, SPINK1, PCA3 et TMPRSS2-ETS était significativement prédictif du cancer de prostate. L'aire sous la courbe ROC du panel était significativement supérieur à celle du PCA3 seul (0,758 vs 0,662). La sensibilité et la spécificité du panel des 4 marqueurs d'intérêt étaient respectivement de 65,9% et 76% respectivement (Laxman et al., 2008). Enfin, Ankerst et al. ont montré que l'intégration de PCA3 dans le calculateur de risque PCPT (prostate cancer chemoprevention trial) améliore sa performance. Cet outil calcule le risque de développer un cancer de prostate et une maladie de haut grade à partir du PSA sérique, du toucher rectal, de l'âge, des antécédents familiaux, de l'appartenance ethnique et du nombre de biopsies réalisées). L'inclusion de PCA 3 au modèle original influe sur le risque. Par exemple, le risque de développer un carcinome prostatique de 65 ans est de 26,5%. Il décroît à 16,9% en cas de PCA3 bas et augmente à 43,1% en cas de PCA3 haut (Ankerst et al., 2008). Perdonà et al ont confirmé ces données sur l'amélioration du calculateur PCPT par l'intégration du PCA3 (Perdonà et al., 2011).

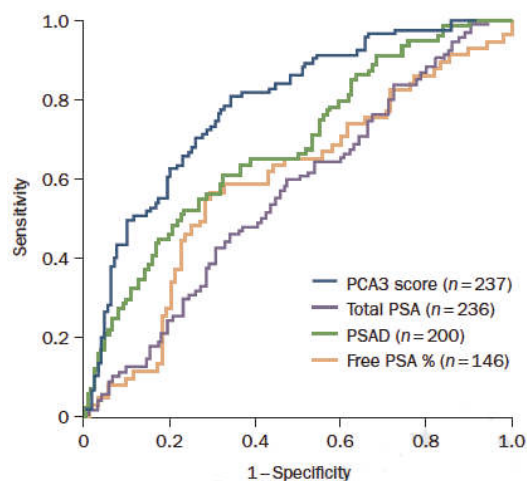


Figure 17. Performances comparées du PCA3 versus PSA dans la détection du cancer de prostate en situation de biopsies initiales. Courbes ROC PCA3 (AUC 0.787), PSA (AUC 0.564), %PSA libre (AUC 0.594) et PSA densité (AUC 0.684). L'aire sous la courbe du PCA3 est significativement supérieure aux autres paramètres (D'après de la Taille et al., 2011).

IV. 3. Intérêt pronostique évoqué : corrélation à l'agressivité du CaP ?

Dans l'ensemble de ces séries évaluant l'intérêt du PCA3 avec comme critère de jugement les biopsies prostatiques, le score PCA3 prédisait le résultat des biopsies (CaP ou non) mais ne semblait pas corrélé au score de Gleason biopsique (Whitman et al. 2008 ; Nakanishi et al., 2008). Cela s'explique probablement par le risque de mauvaise évaluation du score de Gleason sur les biopsies (risque d'upgrading et de downgrading), le PCA3 apparaissant mieux corrélé au Gleason réel sur les pièces de prostatectomies totales, comme nous le verrons dans la suite de ce paragraphe. Récemment, sur une large série multicentrique incluant des patients subissant une première série de biopsies, de la Taille et al. ont démontré une association entre PCA3 et score de Gleason biopsique (score 6 versus 7 ou plus), ainsi qu'un lien avec le volume tumoral sur carottes biopsiques (de la Taille et al., 2011). Récemment, des séries ont étudié la corrélation du score PCA3 préopératoire aux facteurs d'agressivité et au volume tumoral sur les pièces de prostatectomies (van Gils et al., 2008 ; Whitman et al. 2008 ; Nakanishi et al., 2008). Pour van Gils et al la médiane du score PCA3 était significativement plus élevée chez les patients avec cancer significatif sur la pièce de prostatectomie (volume tumoral > 0.5ml, présence de Gleason 4 ou 5). Les autres études publiées confirment la différence significative du score de PCA3 entre les cancers de faible volume tumoral (ou indolents) et les cancers significatifs, avec notamment une courbe ROC discriminante dans la

série de Nakanishi (AUC à 0.76). En analyse multivariée, le score PCA3 ressortait comme facteur prédictif indépendant du volume tumoral (Whitman et al. 2008). Une différence significative en termes d'effraction capsulaire et de score de Gleason sur la pièce de prostatectomie (6 versus 7 et plus) était également retrouvée. Ainsi, l'analyse de l'agressivité du cancer semble montrer que plus le score est élevé, plus le cancer est agressif (Nakanishi et al., 2008). Ces données sur la valeur pronostique du PCA3 sont néanmoins sujettes à débat puisqu'une étude utilisant une technique d'amplification différente, à partir du sédiment urinaire ne retrouve pas de corrélation entre PCA3 et les facteurs d'agressivité histologiques du CaP (van Gils et al., 2008). Dans cette étude suivante, la même équipe confirmait ces résultats. Cependant, Hessels et al ont évalué une petite cohorte de CaP et dans laquelle peu de CaP avaient des caractéristiques favorables : 40% de ces CaP avaient une extension extraprostatique et seulement 10% avaient un volume tumoral <0.5 ml (Hessels et al., 2010). La faible puissance de l'étude pouvait donc expliquer l'absence de mise en évidence de différence significative. Dans une série de 102 patients opérés, l'équipe de Lyon-Sud a confirmé l'association entre PCA3 et volume tumoral, mais n'a pas retrouvé de corrélation avec la présence d'une extension extraprostatique ou le score de Gleason (Vlaeminck-Guillem et al., 2011).

Récemment, une étude allemande prospective sur plus de 300 pièces de prostatectomies (dont 120 avec étude du volume tumoral) a été publiée au même moment que les résultats de cette thèse (Auprich et al., 2011). Dans cette première large série prospective, Auprich et al n'ont pas retrouvé de lien significatif entre PCA3 et extension extraprostatique (atteinte capsulaire ou envahissement des vésicules séminales). En revanche, une corrélation significative a été démontrée entre volume tumoral et score PCA3. Avec un seuil de 24 de PCA3, les sensibilité, spécificité et valeur prédictive négative étaient de 68.8%, 75.7%, et 95.6%, respectivement, pour la prédiction de CaP non significatif, c'est-à-dire un CaP de volume <0.5 ml, intraprostatique et de score de Gleason 6 maximum. Le score médian PCA3 était de 16 en cas de CaP non significatif contre 45 en cas de CaP ne répondant pas à ces critères ($p < 0.001$). Un lien statistiquement significatif était également observé entre PCA3 et score de Gleason élevé, mais les auteurs soulignaient que le score PCA3 ne ressortait pas comme facteur prédictif indépendant de score de Gleason élevé dans des modèles multivariés.

Alors que PCA3 a été associé au volume tumoral et rarement, à l'extension extra prostatique dans certaines séries, l'équipe du *John Hopkins hospital* a exploré le possible rôle de ce marqueur dans la surveillance des patients placés sous surveillance active, par dosages du

PCA3 à l'inclusion ou pendant la surveillance. Le score PCA3 n'a pas été significativement associé à un risque de progression pathologique lors de la réévaluation biopsique précoce de ces patients (Tosoain et al., 2010).

Objectifs du projet de recherche sur le score urinaire PCA3

Les travaux entrepris au cours de cette thèse ont eu pour but d'étudier l'association entre score urinaire PCA3 et les paramètres pathologiques pronostiques du CaP, et particulièrement le volume tumoral et la notion de significativité du CaP. Le recueil des urines a été effectué dans une cohorte prospective de patients, avant l'intervention de prostatectomie totale. L'intérêt clinique recherché était de savoir si le score PCA3 pouvait améliorer la sélection des patients avec CaP à très faible risque, et donc meilleurs candidats à la surveillance active, ou en une question :

Le score urinaire PCA3 est-il un facteur prédictif de la significativité du CaP ?

Résultats

- Publication 1 -

**Increased expression of class III β III-tubulin in castration-resistant
human prostate cancer**

Terry S., **Ploussard G.**, Allory Y., Nicolaiew N., Boissière-Michot F., Maillé P., Kheuang L., Coppolani E., Ali A., Bibeau F., Culine S., Buttyan, R., de la Taille A. and Vacherot, F.

British Journal of Cancer. 2009, Sep 15 ;101(6):951-6.

Présentation de la publication 1

La β -tubuline de classe III (β III-tubuline) est exprimée à l'état physiologique dans les cellules de la lignée neuronale et est aussi sur-exprimée dans plusieurs cancers humains, y compris les carcinomes du poumon, du sein et de l'ovaire. Au moment du début de travail de cette thèse, l'expression de la β III-tubuline n'avait pas été largement étudiée dans le cancer de la prostate (CaP).

Dans cette première étude, nous avons évalué l'expression de β III-tubuline dans 138 échantillons tissulaires de CaP, par immunohistochimie, en comparant les tissus de patients hormono-naïfs aux tissus de patients ayant subi un traitement par suppression androgénique. L'expression de la β III-tubuline a également été examinée dans différentes lignées cellulaires de CaP : androgéno-sensibles (LNCaP) cultivées dans un milieu standard puis dans un milieu appauvri en androgènes; et androgéno-indépendantes (22Rv1, PC3, DU145). Des xénogreffes de tumeur dans des souris hôte castrées ont également été réalisées afin d'évaluer *in vivo* la modification de l'expression de la β III-tubuline en réponse à la castration.

Alors que une intensité d'expression de la β III-tubuline modérée à forte a été détectée dans seulement 4% des tumeurs hormono-naïves (provenant de patients qui n'avaient jamais reçu un traitement hormonal), 25% des échantillons tumoraux provenant de patients traités pendant 3 mois avec une hormonothérapie néoadjuvante et 60% des échantillons de CaP résistants à la castration avaient des niveaux d'expression importants de β III-tubuline. Ces résultats ont été soutenus par les données *in vitro* et *in vivo*. Alors que l'expression de la β III-tubuline était faible dans les lignées androgéno-sensibles, elle augmentait en réponse à une culture dans un milieu appauvri en androgènes et était forte dans les lignées cellulaires déjà androgéno-indépendantes. Le niveau d'expression de la β III-tubuline augmentait de manière significative avec le temps dans les tumeurs LNCaP greffées dans les souris castrées, confirmant *in vivo* le lien entre augmentation d'expression de la β III-tubuline et suppression des androgènes.

Nos données indiquent que l'expression de la β III-tubuline est relativement faible dans le CaP hormono-naïf mais est augmentée par la suppression androgénique. Cette expression de la β III-tubuline en réponse à la castration pourrait donc jouer un rôle important dans le phénomène de résistance à la castration.

Increased expression of class III β -tubulin in castration-resistant human prostate cancer

S Terry^{*,1,2,3}, G Ploussard^{1,2}, Y Allory^{1,2,4}, N Nicolaiew^{1,2}, F Boissière-Michot⁵, P Maillé⁴, L Kheuang^{1,2}, E Coppolani¹, A Ali¹, F Bibeau⁵, S Culine^{1,2,4}, R Buttyan⁶, A de la Taille^{1,2,4} and F Vacherot^{1,2}

¹INSERM, Unité 955, Créteil F-94000, France; ²Université Paris 12, Faculté de Médecine, Créteil F-94000, France; ³Université Paris-Sud 11, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre F-94276, France; ⁴AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service de Pathologie et Urologie, Créteil F-94000, France; ⁵Centre Val d'Aurelle, Service de Pathologie, Montpellier F-34298, France; ⁶Cancer Center, The Ordway Research Institute, Albany, NY 12208, USA

BACKGROUND: Class III β -tubulin (β III-tubulin) is expressed in tissues of neuronal lineage and also in several human malignancies, including non-small-cell lung carcinoma, breast and ovarian cancer. Overexpression of β III-tubulin in these tumours is associated with an unfavourable outcome and resistance to taxane-based therapies. At present, β III-tubulin expression remains largely uncharacterised in prostate cancer.

METHODS: In this report, we evaluated the expression of β III-tubulin in 138 different human prostate tumour specimens by immunohistochemistry from patients with hormone-treated or hormone-untreated prostate cancer. β III-tubulin expression was also examined in various prostatic cancer cell lines including in androgen-sensitive human prostate cancer cells, LNCaP, grown in androgen-depleted medium in 2D cultures or as tumour xenografts when the host mouse was castrated.

RESULTS: Whereas moderate-to-strong β III-tubulin expression was detected in only 3 out of 74 (4%) hormone-naïve tumour specimens obtained from patients who never received hormone therapy, 6 out of 24 tumour specimens (25%) from patients treated for 3 months with neoadjuvant hormone therapy and 24 out of 40 (60%) castration-resistant tumour specimens from chronic hormone-treated patients were found to express significant levels of β III-tubulin. These findings were supported by *in vitro* and *in vivo* settings.

CONCLUSION: Our data indicate that β III-tubulin expression is augmented in prostate cancer by androgen ablation and that the expression of this β -tubulin isoform is associated with the progression of prostate cancer to the castration-resistant state, a stage largely responsible for mortality from prostate cancer.

British Journal of Cancer (2009) 101, 951–956. doi:10.1038/sj.bjc.6605245 www.bjancer.com

Published online 18 August 2009

© 2009 Cancer Research UK

Keywords: class III β -tubulin; prostate cancer; hormone therapy; disease progression; therapeutic resistance

Prostate carcinoma (PCa) is the most common malignancy and the second leading cause of cancer death in men (Ferlay *et al*, 2007; Jemal *et al*, 2008). Despite the current widespread use of prostate-specific antigen (PSA) screening that increases the detection of PCa at an early stage when it is localised to the prostate, ~30% of men treated with surgical or radiation therapies will relapse (Han *et al*, 2001). These men and those who present with locally advanced or overt metastatic PCa are treated by hormonal therapies that deplete circulating androgen levels (Hellerstedt and Pienta, 2002). For most men with advanced PCa, hormone therapy provides a median progression-free survival of 12–33 months until the emergence of a castration-resistant prostate cancer (CRPC) that is refractory to the low androgen levels of the hormone-treated patient. As CRPC generally responds poorly to alternate therapeutics, this form of the disease is overwhelmingly responsible for mortality from PCa.

*Correspondence: Dr S Terry, INSERM, Unité 955, Equipe 7, Faculté de Médecine, 8 rue du Général Sarraïl, Créteil F-94000, France; E-mail: stephane.terry@inserm.fr
Received 20 April 2009; revised 16 July 2009; accepted 20 July 2009; published online 18 August 2009

Recently, however, treatments involving docetaxel-based chemotherapy have shown some benefit for CRPC, although the survival advantage remains relatively limited (Petrylak *et al*, 2004; Tannock *et al*, 2004). Taxanes, of which docetaxel is a derivative, target the microtubules of cancer cells to disrupt the mitotic apparatus leading to cancer cell death. Microtubules are composed of polymers of α - and β -tubulin heterodimers (Orr *et al*, 2003; Seve and Dumontet, 2008). Both α - and β -tubulins exist as multiple isotypes with a complex pattern of distribution among different tissues. Class III β -tubulin (β III-tubulin) is normally expressed in neuronal tissues and in neuroendocrine (NE) cells, and this isoform of β -tubulin is also expressed in some solid tumours, including tumours of neuronal origin and non-small-cell lung, gastric, breast and ovarian carcinomas. For these latter tumours, the expression of β III-tubulin correlates with a poor overall survival as well as with reduced response to taxanes (Ferrandina *et al*, 2006; Gan *et al*, 2007; Galmarini *et al*, 2008; Seve and Dumontet, 2008). Indeed, resistance to taxanes can be induced in cultured human tumour cells by transfection with β III-tubulin, whereas β III-tubulin depletion in cells resulted in the sensitisation to taxanes (Lu and Luduena, 1993; Panda *et al*, 1994; Kavallaris *et al*, 1999; Kamath *et al*, 2005; Shalli *et al*, 2005; Gan *et al*, 2007).

These findings suggest that the presence of β III-tubulin in cancer cell microtubules alters their sensitivity to taxane-based agents.

At present, the expression of β III-tubulin remains relatively uncharacterised in PCa. One study did assess β III-tubulin expression in a small group of localised PCa specimens by immunohistochemistry and reported that β III-tubulin was moderately expressed in both benign and malignant tissues cells of the prostate (Ranganathan *et al*, 1997). However, this evaluation did not include analysis of castration-resistant disease, which is the actual candidate for standard chemotherapeutic intervention. In this study, we provide evidence, on the basis of immunostaining profiles of different classes of prostate tumours, that β III tubulin expression is highly upregulated in prostate cancer cells during the transition from hormone-sensitive to the castration-resistant state. Whereas this characterisation might help to better explain the more aggressive and therapeutic-resistant nature of CRPC, it also has implications for the use of alternative microtubule-targeting therapeutic agents that might be more effective than docetaxel in the treatment of CRPC.

MATERIALS AND METHODS

Human prostate tissue samples

Formalin-fixed, paraffin-embedded prostate tissues were obtained from the Department of Pathology at the Henri Mondor Hospital and from the Cancer Centre in Montpellier, France. Pathological specimens of hormone-naïve (HNPC; $n=74$) and hormone-therapy-treated (HTPC; $n=24$) prostate cancers used in this study were obtained from patients treated for localised disease by radical prostatectomy. Hormone-therapy-treated prostate cancer cases comprised patients who had been treated with 3 months of neoadjuvant therapy with LHRH agonists before surgery. Metastatic CRPC ($n=6$) tissues were liver biopsy samples collected from patients diagnosed with liver metastases as the first site of metastatic disease. Primary CRPC specimens ($n=34$) were collected at the time of the trans-urethral resection of the prostate in patients who experienced disease recurrence after an initial response to hormone therapy. Recurrence was defined as patients having PSA progression despite a complete androgen blockade therapy and a castrated level of testosterone. All samples were obtained with institutional review board approval from the respective institutions.

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemistry was carried out on tissue microarrays (TMAs) containing samples (primary CRPC and HNPC cases) and regular sections (HNPC (10 cases), primary CRPC, HTPC and biopsy samples). For TMA, four replicate cores (with diameter of 0.6 mm) were collected from the donor block. β III-tubulin protein expression was assessed after standard biotin-avidin complex immunohistochemistry using a monoclonal antibody against β III-tubulin (1:500; clone TUJ1; Covance, Emeryville, CA, USA). Protein expression was scored as null (0), weak (1), moderate (2) and strong (3). In this analysis, a case was considered positive only when the score was ≥ 2 in more than 10% of cancer cells, whereas cases with $<10\%$ staining or those that scored <2 were considered negative. β III-tubulin expression was evaluated separately by one pathologist (YA) and by two non-pathologists (ST and GP). The staining assessment was highly reproducible. Immunostains obtained from regular sections of CRPC and HNPC samples were constantly comparable with those obtained in the TMA analysis. Positivity in nerves and axons present in the sections served as positive control. Negative controls were included in each experiment in which the primary antibody was omitted. The absence of immunostaining in red cells was also used

as a negative control as previously described (Ranganathan *et al*, 1997). The following antibodies were used to assess the NE characteristics of the specimens: polyclonal antibodies to chromograninA (CgA; Dako, Trappes, France; A0430); monoclonal antibodies to synaptophysin (Snp88, Biogenex, San Ramon, CA, USA) and NSE (BBS/NC/VI-H14, Dako).

Cell culture

Human prostate cancer cell lines LNCaP (clone FGC), 22Rv1, PC3 and DU145 were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), and the cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin. For androgen-reduced conditions, LNCaP cells were cultured in phenol red-free RPMI supplemented with 10% charcoal-stripped FBS for the indicated time in the presence or absence of Dihydrotestosterone (DHT, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Western blot analysis

Protein lysates were prepared in the RIPA buffer (radioimmunoprecipitation assay lysis buffer) supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and phosphatase inhibitors (25 mmol l^{-1} orthovanadate and 50 mmol l^{-1} NaF) (Sigma-Aldrich). The total protein concentration of the soluble extract was determined using the Bicinchoninic Acid Kit (Sigma-Aldrich). Each protein sample ($30 \mu\text{g}$) was resolved to SDS-PAGE, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Molsheim, France) and incubated with a monoclonal antibody against β III-tubulin (1:10 000) or β -actin (1:16 000; AC-15; Sigma-Aldrich). Immune complexes were visualised by enhanced chemiluminescence detection (ECL plus kit, GE Healthcare, Little Chalfont, UK).

cDNA synthesis and real-time PCR

Quantitative PCR was carried out using SYBR Green dye on an Applied Biosystems 7000 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The conditions for RT-PCR have been described previously (Azoulay *et al*, 2008). The amount of β III-tubulin mRNA levels relative to the housekeeping gene Ribosomal Protein, large, P0 (RPLP0) was determined on the basis of the comparative threshold cycle CT method ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$). The primer sequences for β III-tubulin and RPLP0 have been described previously (Azoulay *et al*, 2008; Frigo and McDonnell, 2008).

Tumour xenografts in athymic mice

2×10^6 LNCaP cells at low passage (P29) were inoculated s.c. with 0.1 ml of Matrigel (Becton Dickinson Labware, Le-Pont-de-Claix, France) in the flank region of 6-week-old male athymic nude mice (Elevage Janvier - Le Genest-Saint-Isle, France) under anaesthesia. Mice bearing tumours between 200 and 300 mm^3 were killed or were surgically castrated through scrotal incision. At the indicated days, LNCaP xenografts were processed after killing to evaluate β III-tubulin expression. All animal procedures were carried out according to local guidelines on animal care and with appropriate institutional certification.

Statistical analysis

χ^2 or Fisher's exact tests were used to assess associations between hormone and β III-tubulin status in human specimens. For *post hoc* comparisons, the Bonferroni correction was applied. To evaluate trend over hormone status, χ^2 for trend was calculated. Immunohistochemistry scoring results of xenografts LNCaP tumours stained for β III-tubulin were analysed using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. All statistical tests used a two-tailed $\alpha = 0.05$ level

of significance and were conducted using SAS statistical software, version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS

Expression of β III tubulin is predominantly expressed in castration-resistant human prostate cancer

A total of 138 different cases of prostatic carcinoma were evaluated in this study. The tumours included 74 specimens of HNPC found in prostatectomy specimens obtained from patients who had never received any form of hormonal therapy, 24 cases of HTPC specimens from patients who received 3 months of adjuvant hormonal therapy before radical prostatectomy and 40 cases of CRPC specimens of which 34 were surgically removed from the prostate to relieve bladder outlet obstruction and 6 cases of castration-resistant liver metastases. All specimens were present in formalin-fixed and paraffin-embedded surgical tissues. The tissues were sectioned and were subsequently immunostained for β III-tubulin using a standard immunoperoxidase-based procedure.

Table 1 β III-tubulin expression before and after hormone therapy

Prostate carcinoma	β III-tubulin negative	β III-tubulin positive
	No. of samples (%)	No. of samples (%)
Hormone-naive PCa (HNPC)	71 (95.9)	3 (4.1)
Hormone-therapy-treated PCa (HTPC)	18 (75)	6 (25)
Castration-resistant PCa (CRPC)	16 (40)	24 (60)
Pearson's χ^2 test:	$P < 0.00001$	
Fisher's exact test:		
HNPC/HTPC	$P = 0.0186$	
HTPC/CRPC	$P = 0.0285$	
HNPC/CRPC	$P < 0.000001$	

Abbreviation: PCa = prostate carcinoma. χ^2 and Fisher's exact tests were used to assess associations between hormone and β III-tubulin status. For *post hoc* comparisons, the Bonferroni correction was applied. All statistical tests used a two-tailed $\alpha = 0.05$ level of significance.

In the HNPC group, accounting for more than half of the specimens, the presence of β III-tubulin expression in cancer cells was relatively rare (Table 1 and Figure 1A). Of these 74 cases, 67 were scored as completely negative (0) and only 3 cases (4%) were considered to be positive, scoring from moderate-to-strong for β III-tubulin in the cancer cells. With the exception of occasional stained cells in the basal compartment, β III-tubulin expression was not detected in either normal basal cells or luminal prostate epithelial cells present in these specimens. The extremely small number of positively stained specimens in this group prevented us from deriving any statistically reliable association with other patient prognostic factors. Of the 24 cases of HTPC evaluated in our study, 6 (25%) were considered to be positive with β III-tubulin immunoreactivity in the moderate-to-strong range in more than 10% of cancer cells (Table 1). Nine cases of HTPC showed complete negative (0) staining, whereas nine other cases in this category were scored as weak or contained only rare (<10%) tumour cells positively stained, and this later group was also recorded as negative. For the overall HTPC group, β III-tubulin expression was found to be significantly higher when compared with the HNPC group as evaluated by Fisher's exact test applying the Bonferroni correction ($P = 0.0186$).

Finally, of the 40 specimens of CRPC that were analysed, the majority (24 or 60%) was considered to be positive (Figure 1A and C). The predominant staining pattern for CRPC specimens was strong and diffuse. Only three cases of CRPC showed a complete absence of staining (see Supplementary Table 1). Statistical analysis of the data showed that the expression of β III-tubulin was significantly correlated with the castration-resistant phenotype ($P < 0.000001$). A further analysis with a trend test also reached statistical significance ($P < 0.0001$). It is noteworthy that, β III-tubulin protein was also expressed in cancer cells of metastatic CRPC lesions present in the liver of patients (Figure 1C). Indeed, the fact that we were able to detect β III-tubulin-positive cancer cells in at least five of six cases of this class suggests that the deregulated expression of β III-tubulin in CRPC disease is not restricted to recurrent lesions localised to the prostate. This finding is also important because metastatic lesions are mainly responsible for both morbidity and mortality of CRPCs. Cumulatively, these results indicate that β III-tubulin expression in human prostate cancer cells is upregulated by hormone therapy and increased further when tumours progress to a castration-resistant stage.

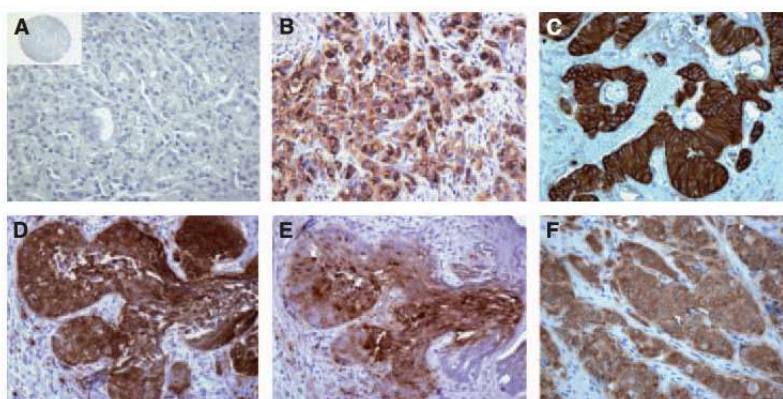


Figure 1 β III-tubulin expression in prostate cancers. (A–C) Representative tissue microarray element, regular section or biopsy sample stained with antibody to β III-tubulin with immunostains showing the absence of staining in hormone-naive prostate cancer (panel A) and strong staining in primary (panel B) and metastatic (panel C) castration-resistant refractory prostate cancers. (D and E) Representative consecutive sections stained with antibodies to β III-tubulin (panel D) or NSE (panel E). Immunostainings show concomitant β III-tubulin and NSE expression in prostate cancer cells. (F) Prostatic small cell carcinoma showing strong immunoreactivity for β III-tubulin. Original magnification $\times 200$; inset, $\times 25$.

Expression of β III tubulin is upregulated by hormone therapy in human prostate cancer LNCaP cells and LNCaP tumours

β III-tubulin is commonly expressed in normal neural tissues and in NE cells (Katsetos *et al*, 2000, 2003). In line with this information, the results showing that β III-tubulin expression that was upregulated in PCa cells obtained from both acute and chronic hormone-treated patients might be a manifestation of the NE trans-differentiation phenomenon that has been associated with prostate cancer cells capable of surviving in a low-androgen environment (Yuan *et al*, 2007). For further exploration of this event, 22 β III-tubulin-positive CRPC specimens were immunostained with antibodies directed against NE markers; namely CgA, synaptophysin (SYN) and NSE. In 6 out of 22 cases analysed, we were able to detect areas showing strong positivity for both β III-tubulin and NSE (Figure 1D and E). In line with this finding, 2 out of 10 evaluable cases demonstrated concomitant β III-tubulin and SYN expression. However, we failed to find any co-expression pattern when using antibodies directed against CgA (eight evaluable cases). It is noteworthy that, β III-tubulin expression was also examined in one case of prostatic small cell carcinoma, an uncommon subtype of PCa with predominance of the NE phenotype (Yao *et al*, 2006). In this case, 100% of cancer cells expressed high levels of β III-tubulin (Figure 1F).

A trans-differentiation phenomenon is observed in cultured androgen-sensitive PCa cells when they are maintained in a medium depleted of androgens (Burchardt *et al*, 1999), and therefore we examined, using western blot analysis, whether androgen-sensitive human prostate cancer LNCaP cells upregulate β III-tubulin when they are switched to androgen-deficient medium. Figure 2A shows that the steady-state levels of β III-tubulin protein were strikingly elevated in the days following growth in the androgen-depleted medium with persistent expression detected up to 3 months under these conditions. The ability of growth in the androgen-depleted medium to upregulate β III-tubulin protein expression was independent of the passage number of the LNCaP cells, as we obtained similar results using either low- (P25) or high-passage (P80) cells (data not shown). In addition, β III-tubulin protein was expressed in various androgen-independent human PCa cell lines, including 22Rv1, PC3 and DU145 after western blot analysis of protein extracts from these cells (Figure 2B). These data agree with a previous finding that β III-tubulin protein expression could be upregulated in LNCaP cells cultured in the androgen-deficient medium for 4 days or after transient suppression of androgen receptor expression using siRNA (Wright *et al*, 2003). We then tested the effect of the AR agonist, DHT on β III-tubulin mRNA expression. To this end, LNCaP cells were incubated for 10 days in an androgen-depleted medium supplemented with 10 nM DHT or with vehicle (ethanol, EtOH). The expression of β III-tubulin was partially abrogated in chronic DHT-treated cells (Figure 2C).

Finally, we sought to extend this observation by analysing β III-tubulin expression in LNCaP tumours after xenografting into athymic male nude mice. Five mice bearing tumours between 200 and 300 mm³ were killed and the tumour specimens were collected, fixed and embedded for sectioning. In all, 10 other mice with tumours of the same size were surgically castrated and then killed at day 11 or 30 post castration to retrieve and process the tumours for immunostaining. Both the pre-castrated and castrated levels of β III-tubulin were immunohistochemically analysed in various LNCaP tumours using the same parameters that were used for human tissues. Our analysis showed that the percentage of β III-tubulin-positive staining cells was significantly elevated in tumour cells from castrated groups in a time-dependent manner. Although only 2.7% of the tumour cells were found to be β III-tubulin positive in the tumour specimens obtained from the pre-castrated group, 6.8 or 19.1% of tumour cells were considered

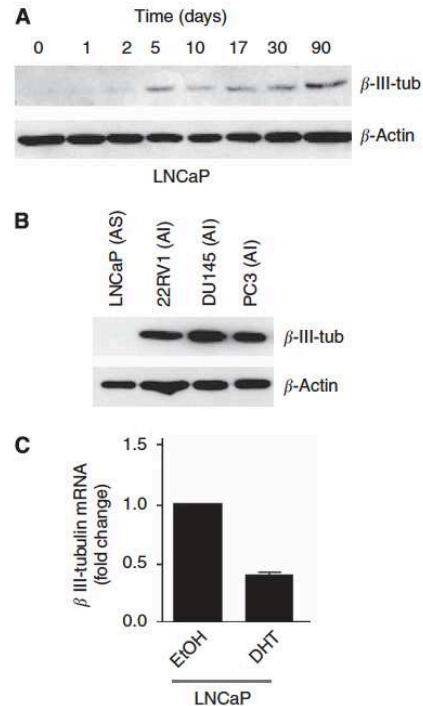


Figure 2 β III-tubulin expression is regulated by androgen depletion in LNCaP cultures and is expressed in androgen-independent PCa lines. **(A)** Time-course expression of β III-tubulin in LNCaPs cultivated in androgen-reduced medium. At day 0, monolayer cultured LNCaP cells were grown in the androgen-reduced medium. Each protein sample (30 μ g) was resolved to SDS-PAGE, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore) and incubated with a monoclonal antibody against β III-tubulin or β -actin as an internal control. **(B)** The same procedure was applied to examine β III-tubulin expression in various PCa cell lines (LNCaP, 22Rv1, DU145 and PC3) maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), AS, androgen-sensitive; AI, androgen-independent. **(C)** β III-tubulin mRNA is reduced on 10 days of stimulation by 10 nM DHT in LNCaP cells relative to the expression in cells maintained in the androgen-reduced medium. Columns, mean \pm s.e.m.

to be positive for β III-tubulin at 11 or 30 days after castration, respectively (Figure 3A and B). In summary, this study of cultured and engrafted human prostate cancer cells supports the idea that hormone therapy leading to the development of CRPC increases the expression of β III-tubulin in cancer cells.

DISCUSSION

This study for the first time provided definitive evidence that β III-tubulin is differentially expressed at the different stages of PCa progression. One notable aspect of our observations with regard to a relationship between β III-tubulin expression and hormone therapy for PCa is the possibility that β III-tubulin expression contributes to the aggressiveness of hormone-treated or castration-resistant PCa similar to the reports for other solid tumours. However, studies investigating the functional ablation of β III-tubulin functions in this setting are required to demonstrate conclusively its functional requirement for the emergence of castration-resistant tumours. Additional studies are also required to better define the mechanisms monitoring β III-tubulin

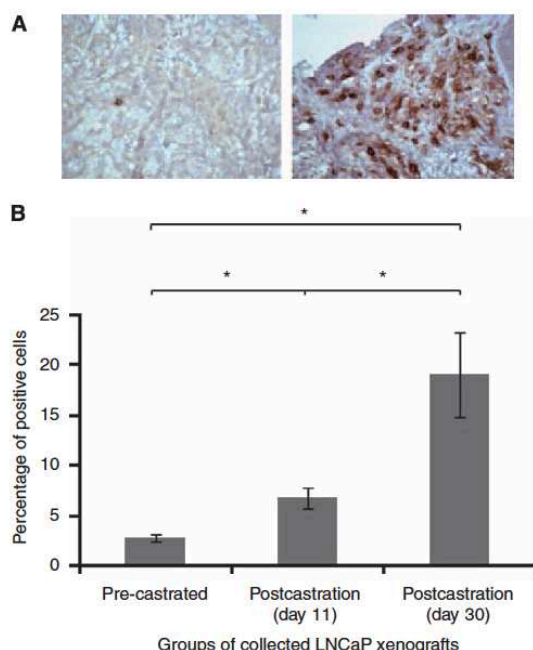


Figure 3 β III-tubulin expression increases after androgen depletion in LNCaP xenografts. **(A)** Representative immunostains in LNCaP xenografts with antibody to β III-tubulin. Immunohistochemical stains show weak or absent staining for LNCaP tumours from a non-castrated mouse (left), while a high proportion of positive cells with intense staining is detected 30 days after castration (right); original magnification, $\times 200$. **(B)** Means of positive cells for β III-tubulin in each group. Kruskal–Wallis test ($P=0.002$) and Mann–Whitney test were used for statistical analysis of the immunohistochemistry scoring results. Columns mean; bars, s.e. $*P<0.05$.

expression. Advanced PCa and castration-resistant PCa have been associated with an attenuated androgen signalling signature (Tomlins *et al*, 2007). This information further supports androgen regulation and the increased expression of β III-tubulin in castration-resistant tumours. Interestingly, one recent study provided evidence for a potential role of oestradiol and oestrogen receptor (ER) in regulating β III-tubulin in breast cancer cells (Sausse-Aim *et al*, 2009). Although it remains to be determined as to whether this regulation implies a genomic or a non-genomic effect of ER, this observation could be of interest in PCa as oestrogen-dependent signature has been linked to aggressive characteristics in this tissue (Bonkhoff *et al*, 2001; Setlur *et al*, 2008). Future work will explore these questions. Recent data also indicate that hypoxia may stimulate β III-tubulin expression in the A2780 ovarian cancer cells (Raspaglio *et al*, 2008). We previously observed that hypoxia response can be altered in CRPC tumours and cell lines (Anastasiadis *et al*, 2002). This may highlight an

alternative mechanism through which β III-tubulin expression is increased in those tumours.

In the hormone-naive PCa group, β III-tubulin expression in cancer cells was found to be restricted to a small number of prostate cancer samples. Our results contrast with a previous report showing that β III-tubulin was consistently detectable in HNPC, although at a relatively low level of expression that was comparable with normal prostate epithelial cells (Ranganathan *et al*, 1997). This difference might be attributable to a more stringent immunostaining protocol. Future studies including larger patient cohorts would help to determine whether β III-tubulin-positive tumours could represent a particular subtype of PCa. In addition, it will be of particular interest to examine the potential value of β III-tubulin in predicting response to microtubule-targeting agents in patients with prostate cancer. This knowledge may be useful for a better management of patients in that it could help to refine decision criteria and to better select patients who are more likely to benefit from chemotherapy regimens. We also believe that one appealing aspect of the association between β III-tubulin expression and hormone therapy for PCa is the indication that anti-cancer chemotherapeutic drugs that preferentially target microtubules with a β III-tubulin component might have greater value for the treatment of CRPC than would docetaxel, which is currently recommended. Whereas we already know that docetaxel therapy does provide some benefit for CRPC patients, this benefit is generally limited to a few months of additional survival (Petrylak *et al*, 2004; Tannock *et al*, 2004). Clearly, the evidence that β III-tubulin can modulate the sensitivity of cancer cells to standard taxane-based cancer therapy gives reason to consider whether other microtubule-targeting drugs with greater efficacy against cancer cells that express β III-tubulin might be more effective in this regard. One candidate for this type of approach may be the epothilone B analogue, ixabepilone, which is being tested against various solid tumours with β III-tubulin expression (Rivera *et al*, 2008; Dumontet *et al*, 2009) and that has already demonstrated activity in CRPCs, although it was with no consideration of β III-tubulin status (Galsky *et al*, 2005). Our results give strong reason to consider β III-tubulin status and to further test this therapeutic for CRPC patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by INSERM, the 'Conseil Général du Val de Marne', the 'Université Paris 12 Val-de-Marne', grants from the ARTP (to ST, GP and FV) and the 'Association pour la Recherche sur le Cancer' (to FV and GP). We are grateful to Pascale Soyeux (Université Paris 12) and Lyna Guilbault (Laval University, Canada) for technical support critical to this work. We thank Julie Cognet and Rachid Souktani (small animal facility, INSERM, U955, Université Paris 12) and Xavier Decrouy (imaging facility, INSERM, U955, Université Paris 12) for providing technical assistance and advice.

Supplementary Information accompanies the paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)

REFERENCES

Anastasiadis AG, Ghafar MA, Salomon L, Vacherot F, Benedit P, Chen MW, Shabsigh A, Burchardt M, Chopin DK, Shabsigh R, Buttyan R (2002) Human hormone-refractory prostate cancers can harbor mutations in the O(2)-dependent degradation domain of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 358–362

Azoulay S, Terry S, Chimingqi M, Sirab N, Faucon H, Gil Diez de Medina S, Moutereau S, Maille P, Soyeux P, Abbou C, Salomon L, Vacherot F, de La

Taille A, Loric S, Allory Y (2008) Comparative expression of Hedgehog ligands at different stages of prostate carcinoma progression. *J Pathol* 216: 460–470

Bonkhoff H, Fixemer T, Hunsicker I, Remberger K (2001) Progesterone receptor expression in human prostate cancer: correlation with tumor progression. *Prostate* 48: 285–291

Burchardt T, Burchardt M, Chen MW, Cao Y, de la Taille A, Shabsigh A, Hayek O, Dorai T, Buttyan R (1999) Transdifferentiation of prostate

- cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. *J Urol* 162: 1800–1805
- Dumontet C, Jordan MA, Lee FF (2009) Ixabepilone: targeting β III-tubulin expression in taxane-resistant malignancies. *Mol Cancer Ther* 8: 17–25
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P (2007) Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18: 581–592
- Ferrandina G, Zannoni GF, Martinelli E, Paglia A, Gallotta V, Mozzetti S, Scambia G, Ferlini C (2006) Class III beta-tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 12: 2774–2779
- Frigo DE, McDonnell DP (2008) Differential effects of prostate cancer therapeutics on neuroendocrine transdifferentiation. *Mol Cancer Ther* 7: 659–669
- Galmarini CM, Treilleux J, Cardoso F, Bernard-Marty C, Durbecq V, Gancberg D, Bissery MC, Paesmans M, Larsimont D, Piccart MJ, Di Leo A, Dumontet C (2008) Class III beta-tubulin isotype predicts response in advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or docetaxel. *Clin Cancer Res* 14: 4511–4516
- Galsky MD, Small EJ, Oh WK, Chen I, Smith DC, Colevas AD, Martone L, Curley T, Delacruz A, Scher HI, Kelly WK (2005) Multi-institutional randomized phase II trial of the epothilone B analog ixabepilone (BMS-247550) with or without estramustine phosphate in patients with progressive castrate metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 23: 1439–1446
- Gan PP, Pasquier E, Kavallaris M (2007) Class III beta-tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer. *Cancer Res* 67: 9356–9363
- Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC (2001) Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am* 28: 555–565
- Hellerstedt BA, Pienta KJ (2002) The current state of hormonal therapy for prostate cancer. *CA Cancer J Clin* 52: 154–179
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58: 71–96
- Kamath K, Wilson L, Cabral F, Jordan MA (2005) β III-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *J Biol Chem* 280: 12902–12907
- Katsetos CD, Herman MM, Mork SJ (2003) Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 55: 77–96
- Katsetos CD, Kontogeorgos G, Geddes JF, Herman MM, Tsimarapapastamatiou H, Yu Y, Sakkas LI, Tsokos M, Patchefsky AS, Ehya H, Cooper HS, Provencio J, Spano AJ, Frankfurter A (2000) Differential distribution of the neuron-associated class III beta-tubulin in neuroendocrine lung tumors. *Arch Pathol Lab Med* 124: 535–544
- Kavallaris M, Burkhart CA, Horwitz SB (1999) Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br J Cancer* 80: 1020–1025
- Lu Q, Luduena RF (1993) Removal of beta III isotype enhances taxol induced microtubule assembly. *Cell Struct Funct* 18: 173–182
- Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB (2003) Mechanisms of taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22: 7280–7295
- Panda D, Miller HP, Banerjee A, Luduena RF, Wilson L (1994) Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11358–11362
- Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara Jr PN, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moynour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED (2004) Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 351: 1513–1520
- Ranganathan S, Salazar H, Benetatos CA, Hudes GR (1997) Immunohistochemical analysis of beta-tubulin isotypes in human prostate carcinoma and benign prostatic hypertrophy. *Prostate* 30: 263–268
- Raspaglio G, Filippetti F, Prislei S, Penci R, De Maria I, Cicchillitti L, Mozzetti S, Scambia G, Ferlini C (2008) Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1 α binding to its 3' flanking region. *Gene* 409: 100–108
- Rivera E, Lee J, Davies A (2008) Clinical development of ixabepilone and other epothilones in patients with advanced solid tumors. *Oncologist* 13: 1207–1223
- Saussède-Aim J, Matera EL, Ferlini C, Dumontet C (2009) β 3-tubulin is induced by estradiol in human breast carcinoma cells through an estrogen-receptor dependent pathway. *Cell Motil Cytoskeleton* 66: 378–388
- Setur SR, Mertz KD, Hoshida Y, Demichelis F, Lupien M, Perner S, Sboner A, Pawitan Y, Andren O, Johnson LA, Tang J, Adami HO, Calza S, Chinnaiyan AM, Rhodes D, Tomlins S, Fall K, Mucci LA, Kantoff PW, Stampfer MJ, Andersson SO, Varenhorst E, Johansson JE, Brown M, Golub TR, Rubin MA (2008) Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 100: 815–825
- Seve P, Dumontet C (2008) Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol* 9: 168–175
- Shalli K, Brown I, Heys SD, Schofield AC (2005) Alterations of beta-tubulin isotypes in breast cancer cells resistant to docetaxel. *FASEB J* 19: 1299–1301
- Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Theodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 351: 1502–1512
- Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM, Kalyana-Sundaram S, Wei JT, Rubin MA, Pienta KJ, Shah RB, Chinnaiyan AM (2007) Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet* 39: 41–51
- Wright ME, Tsai MJ, Aebersold R (2003) Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* 17: 1726–1737
- Yao JL, Madeb R, Bourne P, Lei J, Yang X, Tickoo S, Liu Z, Tan D, Cheng L, Hatem F, Huang J, Anthony di Sant'Agnes P (2006) Small cell carcinoma of the prostate: an immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 30: 705–712
- Yuan TC, Veeramani S, Lin MF (2007) Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* 14: 531–547

- Publication 2 -

**Class III β III-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness
and patient response to docetaxel-based chemotherapy**

Ploussard G., Terry S., Maillé P., Allory Y., Sirab N., Kheuang L., Soyeux P., Nicolaiew N., Coppolani E., Paule B., Salomon L., Culine S., Buttyan, R.,
Vacherot, F. and de la Taille A.

Cancer Research. 2010, Nov 15 ;70(22):9253-64.

Présentation de la publication 2

L'expression de la β III-tubuline a été corrélée à la progression tumorale et à la résistance à la chimiothérapie par taxanes dans plusieurs cancers humains (cancer du poumon, de l'ovaire, du sein). Cependant son utilisation en tant que biomarqueur dans le CaP demeure largement inexplorée.

Dans cette seconde publication, nous décrivons l'expression de la β III-tubuline (étude par immunohistochimie) au sein de tissus tumoraux, obtenus à plusieurs stades de l'histoire naturelle du CaP : stade hormono-naïf et stade de la résistance à la castration.

Au stade localisé, l'expression de la β III-tubuline était significativement associée à l'agressivité tumorale parmi une cohorte de patients traités par prostatectomie totale. Cette expression était un marqueur prédictif indépendant de récurrence biochimique après traitement. Au stade de la résistance à la castration, l'expression initiale de la β III-tubuline dans les cellules tumorales était un facteur prédictif indépendant de survie globale pour les patients recevant une chimiothérapie par docétaxel.

Dans des expériences *in vitro*, l'introduction de docétaxel au milieu de culture générait une augmentation de l'expression de la β III-tubuline. La manipulation de cette expression dans des lignées cellulaires humaines de CaP modifiait la survie des cellules en réponse au traitement par docétaxel. Ainsi, la sur-expression de la β III-tubuline par transfection de son ORF induisait une augmentation de la résistance des cellules au docétaxel alors que l'extinction de l'expression de la β III-tubuline par ARN interférence sensibilisait les cellules à cette drogue.

Ces résultats suggéraient un rôle de la β III-tubuline en tant que médiateur de la résistance des cellules de CaP au docétaxel, et en tant que biomarqueur théranostique, c'est-à-dire prédictif de la réponse à la chimiothérapie à base de docétaxel ainsi que cible pour le traitement de CaP résistant à la castration et au docétaxel.

Class III β -Tubulin Expression Predicts Prostate Tumor Aggressiveness and Patient Response to Docetaxel-Based Chemotherapy

Guillaume Ploussard^{1,2,3}, Stéphane Terry^{1,2,6,7}, Pascale Maillé⁴, Yves Allory^{1,2,4}, Nanor Sirab^{1,2}, Laurence Kheuang¹, Pascale Soyeux¹, Nathalie Nicolaiew^{1,2}, Estelle Coppolani¹, Bernard Paule⁵, Laurent Salomon^{1,2,3}, Stéphane Culine^{1,2,5}, Ralph Buttyan⁸, Francis Vacherot^{1,2}, and Alexandre de la Taille^{1,2,3}

Abstract

Expression of class III β -tubulin (β III-tubulin) correlates with tumor progression and resistance to taxane-based therapies for several human malignancies, but its use as a biomarker of tumor behavior in prostate cancer (PCa) remains largely unexplored. Here, we describe β III-tubulin immunohistochemical staining patterns of prostate tumors obtained from a broad spectrum of PCa patients, some of whom subsequently received docetaxel therapy for castration-resistant PCa (CRPC). Elevated β III-tubulin expression was significantly associated with tumor aggressiveness in PCa patients with presumed localized disease, as it was found to be an independent marker of biochemical recurrence after treatment. Additionally, β III-tubulin expression in tumor cells was an independent predictor of lower overall survival for patients receiving docetaxel-based chemotherapy for CRPC. Manipulation of β III-tubulin expression in human PCa cell lines using a human β III-tubulin expression vector or β III-tubulin small interfering RNA altered cell survival in response to docetaxel treatment in a manner that supports a role for β III-tubulin expression as a mediator of PCa cell resistance to docetaxel therapy. Our findings suggest a role for β III-tubulin as candidate theranostic biomarker to predict the response to docetaxel-based chemotherapy as well as to target for treatment of docetaxel-resistant CRPC.

Cancer Res; 70(22); 9253–64. ©2010 AACR.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common solid malignancy and the second leading cause of death attributable to cancer in men (1). Despite the widespread use of prostate-specific antigen (PSA) testing to screen for early-stage PCa, men continue to be diagnosed with locally advanced or metastatic disease, and ~30% of newly diagnosed patients treated with curative intent will eventually relapse during follow-up (2). Treatments at this advanced stage usually include androgen deprivation therapy to deplete systemic androgens in patients, thus reducing the levels of a known

PCa growth factor. This treatment is most often only transiently effective because prostate tumor cells can progress to a seeming androgen-independent (AI) growth phase now diagnosed as castration-resistant PCa (CRPC; ref. 3). Once at this stage, docetaxel-based chemotherapy has been shown to improve, although the survival advantage is relatively limited (4, 5). At this time, several molecular markers have been proposed to have dependent or independent utility for PCa patient prognostic assessments (6, 7), but these latter biomarkers remain unproven. Here, we discuss our efforts to evaluate the potential utility of class III β -tubulin for purposes of prognostication of PCa patient response to early, localized therapy or to late-stage, taxane-based chemotherapy.

Taxanes constitute an important group of chemotherapeutic agents that specifically target the β -tubulin subunit of microtubules. By targeting microtubule activity, taxanes can block cell mitosis and induce apoptosis, especially in tumor cells (8). A growing body of preclinical and clinical data now suggests that increased expression of one particular β -tubulin isoform, class III β -tubulin (β III-tubulin), confers cancer cell resistance to taxanes (9–11) and that β III-tubulin resistance to taxanes is clinically relevant for human lung, breast, and ovarian cancers (12). For these human malignancies, high tumor cell expression of β III-tubulin was associated with significantly poorer survival rates in patients treated with taxane-based chemotherapy (13–17). For lung cancer, one study suggested that tumor cell β III-tubulin expression

Authors' Affiliations: ¹INSERM, Unité 955; ²Université Paris-Est, Faculté de Médecine; ³AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service d'Urologie; ⁴AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Département de Pathologie et Centre d'Investigations Biomédicales; ⁵AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service d'Oncologie Médicale, Créteil, France; ⁶Université Paris-Sud 11, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France; ⁷Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, New York; and ⁸Cancer Center, The Ordway Research Institute, Albany, New York

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Author: Guillaume Ploussard, INSERM, 8, rue du Général Sarrail, Créteil 94010, France. Phone: 33-1-49-81-12-11; Fax: 33-1-49-81-25-68; E-mail: g.ploussard@gmail.com.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1447

©2010 American Association for Cancer Research.

was a prognostic factor for men who did not receive adjuvant chemotherapy (18).

For PCa, despite evidence from *in vitro* studies showing that β -tubulin isotype expression was altered in paclitaxel-resistant cells, there has been only little informative clinical data evaluating the prognostic or predictive value of β III-tubulin expression in patient tumor cells (19, 20). Previously, we showed that expression of β III-tubulin was increased in CRPC and that expression of this tubulin isoform might have a role in progression to CRPC (21). The aim of the present study was to determine whether β III-tubulin expression might have prognostic value for hormone-naive PCa (HNPC) patients treated by surgery or for CRPC patients treated with taxane-based therapy (docetaxel). Here, we evaluated clinical PCa specimens for expression levels of β III-tubulin by immunohistochemistry and manipulated β III-tubulin expression in PCa cell lines to determine the effects of this manipulation on *in vitro* responsiveness to docetaxel.

Materials and Methods

Cell culture

Human PCa cell lines LNCaP (clone FGC), 22Rv1, and DU145 were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin. For this study, low-passage cells were used (<20 passages). The LNCaP-AI variant (passages 16–20) was derived from LNCaP cultures maintained >18 months of growth in androgen-depleted medium (phenol red-free RPMI 1640 supplemented with 10% charcoal-stripped FBS). LNCaP and 22Rv1 were authenticated through cell morphology monitoring, response to androgen treatment, and expression of androgen receptor (AR), which harbor mutations in these lines (22–24). DU145 was authenticated by lack of AR expression, expression of mutant *TP53* (24), and assessment of the invasive behavior using Boyden chamber assays.

Western blot analysis

Protein lysates were prepared in the radioimmunoprecipitation assay lysis buffer supplemented with protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and phosphatase inhibitors (25 mmol/L orthovanadate and 50 mmol/L NaF; Sigma-Aldrich). The total protein concentration of the soluble extract was determined using the bicinchoninic acid kit (Sigma-Aldrich). Each protein sample (30 μ g) was resolved to SDS-PAGE, transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore), and incubated with a monoclonal antibody against β III-tubulin (1:10,000; clone TUJ1; Covance) or β -actin (1:16,000; AC-15; Sigma-Aldrich). Primary antibodies against the other β -tubulin isotypes were from Abcam. Immune complexes were visualized by enhanced chemiluminescence detection (ECL Plus kit, GE Healthcare).

cDNA synthesis and real-time PCR

Quantitative PCR was carried out using SYBR Green dye on an Applied Biosystems 7000 Real Time PCR system. The conditions for reverse transcription-PCR (RT-PCR) have been

described previously (25). The amount of β III-tubulin mRNA levels relative to the housekeeping gene ribosomal protein, large, P0 (RPLP0) was determined on the basis of the comparative threshold cycle C_T method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). The primer sequences for β III-tubulin and RPLP0 have been described previously (25, 26).

Construction of β III-tubulin expression vector and generation of stable β III-tubulin-overexpressing cells

The open reading frame (ORF) encoding β III-tubulin was purchased from Invitrogen (Ultimate ORF clone, clone ID IOH3755, NM 00608.2). The β III-tubulin ORF was provided in the Gateway entry vector pENTR 221. The β III-tubulin expression was constructed by recombining the β III-tubulin pENTR 221 into the destination vector pcDNA 3.2/V5-DEST (Invitrogen) via the LR reaction according to the manufacturer's instructions (Gateway LR clonase II enzyme mix, Invitrogen). The resulting vector was designated as pcDNA-TUBB3. LNCaP and DU145 cells were seeded at the density of 1.5×10^5 in 100-mm culture dishes in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. The next day, cells were transfected with 4 μ g of pcDNA-TUBB3 vector using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Cells were selected in geneticin (G418, 400 μ g/mL) for 3 weeks. Resistant colonies were isolated and allowed to grow as monoclonal population. Clones expressing the different levels of β III-tubulin were selected, as determined by Western blot analysis, for further studies.

Small interfering RNA transfection

Small interfering RNA (siRNA) against *TUBB3* and control nontargeting siRNA were obtained from Invitrogen, Inc. Three specific Stealth RNAi sequences were tested: TUBB3HSS115886 (5'-GACAUCUCUUCAGGCCUGACAAUUU-3'), TUBB3HSS115887 (5'-GCAUCAUGAACACCUUCAGCGUCGU-3'), and TUBB3HSS173592 (5'-CAGCUGGAGCGGAUCAGCGUCUACU-3'). The nonsilencing control siRNA, which has no sequence homology to any known human gene sequence, was used as a control for nonsequence-specific effects in all experiments.

Subconfluent human prostate cells were transfected with siRNA by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Seventy-two hours after the transfection, the efficacy of the siRNA knockdown was assessed by quantitative RT-PCR and immunoblotting. The optimal amount of siRNA used for transfection was determined as being 50 nmol/L, and the best siRNA sequence allowing to reduce >70% of β III-tubulin expression was identified as the sequence TUBB3HSS115887.

Docetaxel dose-response curve

To assess the effect of β III-tubulin overexpression on chemoresistance, 1×10^4 cells were seeded in 96-well microtiter plates. The next day, cells were treated with docetaxel at growing concentrations for 72 hours. Cell viability was determined by MTT assay.

To assess the effect of the combination treatment of β III-tubulin silencing plus docetaxel, 22Rv1 cells were transfected with 50 nmol/L of Stealth siRNA against β III-tubulin or

Table 1. Patient's cohort characteristics of the HNPC cohort

Age (y)	
Mean	64.5
Median	65.0
Range	47.1–75.0
PSA (ng/mL)	
Mean	14.2
Median	9.4
Range	1.4–113.0
Prostate weight (g)	
Mean	55.6
Median	50.0
Range	10.0–210.0
Clinical stage, no. (%)	
T1	175 (67.8)
T2 or more	83 (32.2)
Gleason score, no. (%)	
≤ 6	123 (47.7)
7	73 (28.3)
≥ 8	62 (24.0)
pT stage, no. (%)	
pT2	150 (58.1)
pT3	86 (33.4)
pT4	22 (8.5)
Extraprostatic extension, no. (%)	96 (37.2)
Positive margins, no. (%)	56 (21.7)
Seminal vesicle invasion, no. (%)	56 (21.7)
Positive lymph nodes, no. (%)	23 (8.9)
Duration of follow-up (mo)	
Mean	61.5
Median	48.3
Range	0.6–170.7
Recurrence, no. (%)	62 (24.0)

NOTE: Clinicopathologic characteristics of patients with clinically HNPC ($n = 258$).

control vector as described above and then treated with docetaxel at various concentrations for 3 days. Cell viability was then determined by MTT assay.

The cell survival curve was presented as the percentage of surviving cells versus the concentration of docetaxel. The IC_{50} values were defined as the concentration of drug required for 50% cell survival, and were calculated using a logarithmic regression. Results were expressed as means \pm SE. Each assay was done in triplicate and repeated on three separate experiments.

Patients and tissue samples

Written informed consent was obtained. The study included 258 patients who had undergone radical prostatectomy for localized PCa between November 1988 and May 2007. Demographics, clinical and biological data, pathologic parameters, and outcomes in terms of PSA recurrence and adjuvant treatment of 258 patients with HNPC were collected

prospectively in a database and reviewed in a retrospective manner. Clinical, biological, and pathologic parameters and follow-up data are listed in Table 1. No patient had received neoadjuvant therapy.

The study also included 37 patients with CRPC stage and analyzable initial hormone-naive tissue who received docetaxel-based chemotherapy as first-line treatment between January 2002 and July 2008. Demographics, clinical and biological data, pathologic parameters, and outcomes in terms of PSA were collected prospectively in a database and reviewed in a retrospective manner. The mean age was 68.1 years, and the mean PSA level was 135.0 ng/mL at PCa diagnosis. The median Gleason score was 8 at diagnosis. Bone metastases were present in 21 patients at PCa diagnosis. Docetaxel-based chemotherapy was administered for clinical and/or biochemical progression in patients with CRPC after a mean duration of androgen ablation therapy of 33.2 months. The patient's hormone-refractory status was defined as a progressive increase in PSA level after androgen blockade. Hormonal castration had to be biologically confirmed. Chemotherapy was combined with low-dose orally administered prednisone.

Formalin-fixed, paraffin-embedded specimens were obtained from the Department of Pathology at the Henri Mondor Hospital (Créteil, France). Immunostaining was performed (*a*) on the initial prostatic biopsies of 37 patients who had received first-line docetaxel-based chemotherapy and (*b*) on tissue microarrays (TMA) for the HNPC patient's cohort. When considering TMAs, for each PCa case, four replicate cores (diameter, 0.6 mm) were obtained from cancer foci and four additional cores were also taken from nonneoplastic areas as previously described (25).

Immunohistochemistry (Supplementary Materials and Methods)

Immunostaining was done on 5- μ m tissue sections mounted on silane-coated slides. β III-tubulin protein expression was evaluated using a monoclonal antibody specific for the β III-tubulin isotype (1:500; clone TUJ1).

A numerical score was assigned for the epithelial cells of each specimen. Samples with no stained tumor cells were scored as 0. A score of 1, 2, or 3 was assigned to samples with weak, moderate, or strong staining, respectively, independently of the proportion of stained tumor cells. The proportion of immunostained tumor cells was also assessed. For TMA analysis, the mean of staining in the four neoplastic cores was considered. Only cytoplasmic staining was taken into account. All of the slides were independently evaluated by three observers (G. Ploussard, S. Terry, and Y. Allory). Observers were blinded to the patients' adjuvant treatment, final pathologic assessment, and outcome. Interrater reproducibility was 95%. Different scores were reassessed and consensus between observers was defined. Staining intensity seen in nerves and axons served as an internal positive control. The absence of immunostaining in red cells was used as negative control (27). Photomicrographs were taken using a Zeiss Axioplan2 microscope (Carl Zeiss) from imaging platform (INSERM, U955, UPEC).

Statistical analysis

Null expression (0% of stained cells) and weak to strong expression (scores 1–3 and $\geq 5\%$ of stained cells) were grouped separately as dichotomic variables for statistical analysis.

The Student's *t* test was used for continuous data. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used when data were not normally distributed. Qualitative data were tested using a χ^2 or Fisher's test as appropriate. The Gleason score was dichotomized according to the definition of high-risk PCa as follows: Gleason score < 8 versus ≥ 8 (2). Survival curves were generated by the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. The Cox proportional hazards model was used to evaluate the independent value of β III-tubulin expression among commonly used prognostic factors. Hazard ratios (HR) were presented with 95% confidence interval (CI).

In the CRPC cohort, the starting point of the analysis was the first cycle of chemotherapy. The PSA Working Group criteria were used to evaluate PSA responses: we chose a decrease of $> 75\%$ from the baseline PSA level as the criterion for PSA response (28). The primary endpoint was overall survival (OS) defined as the time from the start of chemotherapy until death from any cause or last follow-up for censored patients. Time to progression was defined as the time between the first cycle of chemotherapy and an elevated PSA finding.

In the HNPC cohort, Biochemical recurrence-free survival (RFS) was analyzed. The day of surgery was reported as the starting point of analysis. Recurrence was defined as the first detectable elevation of PSA above 0.20 ng/mL (at least two consecutive measurements).

A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant, and all *P* values were two-sided. SPSS 13.0 software was used for statistical analyses.

Results

Prognostic value of β III-tubulin expression for PCa recurrence in HNPC patients treated by radical prostatectomy

We had previously reported that β III-tubulin was expressed significantly lower in HNPC compared with CRPC. In our previous study, however, the small patient sample size in the HNPC group ($n = 74$) prevented us from deriving any statistically reliable association with other patient prognostic factors (21). Here, we extended our assessment of β III-tubulin expression to PCa-containing specimens obtained from 258 PCa patients that were treated by radical prostatectomy (Table 1). We identified β III-tubulin expression in 43 of the 258 specimens from patients with HNPC (16.7%; Table 2). Strong β III-tubulin immunostaining (score of 3.0) was detected in 6.2% of tumors. When β III-tubulin expression was observed, the percentage of positively stained tumor cells showed a wide range of variability (range, 5–100%; mean, 25.8%; median, 10%). Representative examples of immunostaining are shown in Fig. 1A to C. β III-tubulin expression was not detected in nonmalignant prostate basal or luminal epithelial cells adjacent to the tumor. Correlations of β III-

tubulin immunostaining with histoprognostic parameters are described in Table 2. We found that positive immunostaining was significantly associated with a Gleason score of ≥ 8 [$P = 0.001$; odds ratio (OR), 3.17], a primary Gleason grade of 4 or 5 ($P = 0.013$; OR, 2.28), a pT stage of ≥ 3 ($P = 0.042$; OR, 1.97), an extraprostatic extension ($P = 0.028$; OR, 2.10), and positive lymph nodes ($P = 0.034$; OR, 3.05). It is noteworthy that β III-tubulin expression was also significantly associated with a high risk for biochemical recurrence ($P = 0.029$; OR, 2.15). The intensity of immunostaining was also correlated with the histoprognostic parameters. A strong immunostaining, defined by a staining score of 3, was also markedly associated with a Gleason score of ≥ 8 ($P < 0.001$), extraprostatic extension ($P < 0.001$), positive surgical margins ($P = 0.025$), pT stage ($P < 0.001$), and positive lymph nodes ($P = 0.043$) when compared with a null-to-moderate staining (score, 0, 1, or 2). The 3- and 5-year RFS was 84.5% and 75.4%, respectively, in patients with no β III-tubulin expression in the prostate tumor. By contrast, the 3- and 5-year RFS was 72.4% and 59.4%, respectively, in patients expressing β III-tubulin in prostate tumor cells. The log-rank test was significant with a *P* value of 0.002 (Fig. 1D). In patients with favorable pathologic features (Gleason < 8 , pT2 cancer, and negative surgical margin), the 5-year RFS was 91.7% in β III-tubulin-negative patients versus 79.6% in β III-tubulin-positive patients ($P = 0.006$). Furthermore, in multivariate analysis using a Cox model taking into account Gleason score, pT stage, and surgical margin status, β III-tubulin expression was an independent predictor of biochemical recurrence ($P = 0.029$; HR, 1.95; 95% CI, 1.07–3.55).

Increased expression of β III-tubulin in PCa cell lines in response to *in vitro* docetaxel treatment

We previously reported that β III-tubulin expression was increased in LNCaP cells (21), which were grown in androgen-depleted medium or in tumor xenografts from these cells after castration of the host mouse. In the present work, we tested whether docetaxel treatment could affect β III-tubulin expression in two AI PCa cell lines: LNCaP-AI that expresses low levels of β III-tubulin or 22Rv1 that endogenously expresses higher levels of β III-tubulin. LNCaP-AI variant cells were treated with docetaxel at 3 nmol/L for up to 30 days. As shown in Fig. 2A, using Western blots to assess the levels of expressed β III-tubulin protein, expression was continuously elevated by exposure to docetaxel over the time course of the experiment. It is noteworthy that the class II β -tubulin, an isotype known to be predominantly expressed in the brain, also increased along with total β -tubulin under docetaxel exposure, whereas no significant increase was seen for β I and β IV isotypes (Fig. 2A; Supplementary Fig. S1). To corroborate these findings, we set out to further characterize the expression of β -tubulin isotypes in 22Rv1 under exposure to docetaxel at 15 nmol/L for 72 hours. The 22Rv1 PCa cell line is derived from a primary tumor xenograft, CWR22, which relapsed during androgen ablation (29). These cells express at least three AR isoforms that seem to be constitutively active, likely promoting proliferation as well as the expression of multiple AR-dependent genes in a ligand-independent

Table 2. Association between β III-tubulin expression and clinicopathologic parameters

	Patients with no TUBB3 expression (n = 215)	Patients with TUBB3 expression (n = 43)	Univariate analysis	
			P	OR (95% CI)
Age (y), no. (%)				
<65	105 (48.8)	19 (44.2)	0.577	
>65	110 (51.2)	24 (55.8)		
Mean	64.6	63.8	0.399	
Clinical stage, no. (%)				
T1	151 (70.2)	25 (58.2)	0.068	
T2 or more	64 (29.8)	18 (41.9)		
PSA (ng/mL), no. (%)				
<10	119 (55.3)	19 (44.2)	0.180	
>10	96 (44.7)	24 (55.8)		
Mean	13.1	19.5	0.066	
Gleason score, no. (%)				
≤ 7	172 (80.0)	24 (55.8)	0.001	3.17 (1.59–6.30)
≥ 8	43 (20.0)	19 (44.2)		
Primary Gleason grade 4 or 5, no. (%)	72 (33.5)	23 (53.5)	0.013	2.28 (1.18–4.43)
Prostate weight (g), no. (%)				
<50	88 (40.9)	22 (51.2)	0.264	
>50	127 (59.1)	21 (48.9)		
Mean	55.9	54.2	0.724	
pT stage, no. (%)				
pT2	131 (60.9)	19 (44.2)	0.042	1.97 (1.02–3.82)
pT3–4	84 (39.1)	24 (55.8)		
Extracapsular extension, no. (%)	74 (34.4)	22 (51.2)	0.028	2.10 (1.08–4.09)
Positive surgical margins, no. (%)	43 (20.0)	13 (30.2)	0.116	
Seminal vesicle invasion, no. (%)	42 (19.5)	14 (32.6)	0.059	
Positive lymph nodes, no. (%)	15 (7.0)	8 (18.6)	0.034	3.05 (1.20–7.73)
Recurrence, no. (%)	46 (21.4)	16 (37.2)	0.029	2.15 (1.07–4.33)
Duration of follow-up, mo (mean)	62.1	58.4	0.603	

NOTE: Clinical data, pathologic features, and PSA failure: correlations with β III-tubulin expression in HNPC samples (univariate analysis).

manner (23). Consistent with earlier observations, upregulation of β III-tubulin protein (Fig. 2B; Supplementary Fig. S2A) as well as mRNA levels (Supplementary Fig. S2B) was evident in docetaxel-treated 22Rv1 cells. The β II and total protein levels were similarly increased in docetaxel-treated cells in contrast to that found for β I and β IV isotypes. Together, these data show that both acute and chronic exposure of AI PCa cells to docetaxel upregulates β III-tubulin along with a seeming general increase of total β -tubulin.

Stable overexpression of β III-tubulin in PCa cell lines confers resistance to docetaxel

To assess whether overexpression of β III-tubulin was sufficient to confer resistance to docetaxel in PCa cells, we established PCa cell clones, from LNCaP or DU145 cells, stably expressing the human *TUBB3* gene (β III-tubulin-transfected clones) under the control of a cytomegalovirus promoter. The AR-negative DU145 line is derived from a brain metastasis. These cells might represent a very aggressive stage of PCa as reflected by their growth rate and their invasive behavior

in vitro and *in vivo* (30). LNCaP cells are androgen-sensitive PCa cells originated from a lymph node metastasis. Lymph nodes are the most common and earliest sites for PCa metastasis, thus rendering this model particularly attractive for the research community (22). Differential expression of β III-tubulin protein between control vector-transfected LNCaP cells and β III-tubulin-transfected clones was established by Western blot analysis (Fig. 2C). Despite some decrease of β II isotype was seen in β III-tubulin-transfected LNCaP cells (β III-tubulin clone 1), forced expression of β III-tubulin did not seem to affect consistently the expression of the β -tubulin isotypes. Interestingly, the β III-tubulin-overexpressing LNCaP cells had a neuroendocrine-like appearance (Supplementary Fig. S3), suggesting that forced expression of β III-tubulin is associated with a transdifferentiation process that has been frequently described for these cells (31, 32). To examine the effects of β III-tubulin overexpression, we measured the half-time inhibitory concentration (IC_{50}) of docetaxel assessed by measuring cell viability at 72 hours after exposure. The cell viability assays showed that β III-tubulin-transfected

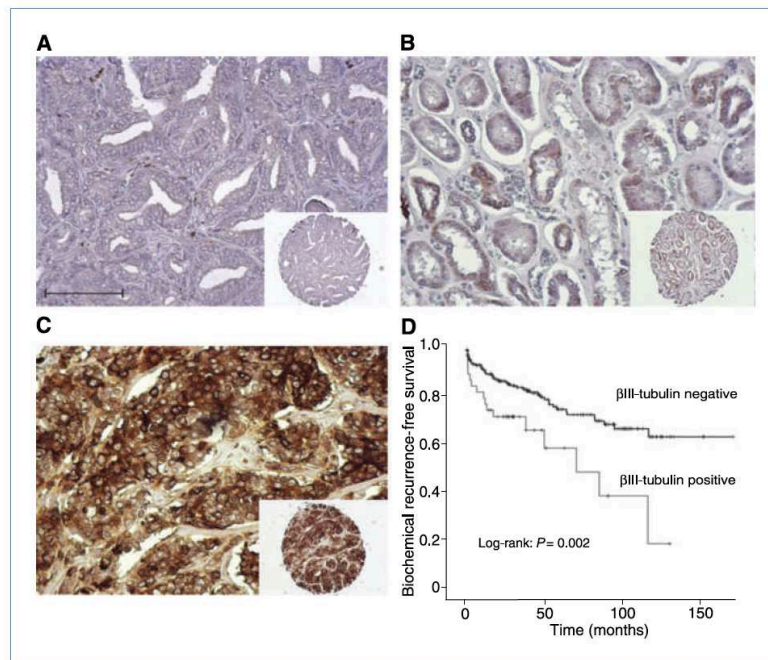


Figure 1. Prognostic value of β III-tubulin expression in predicting the biochemical recurrence after radical prostatectomy in HNPC PCa patients. A to C, representative staining for β III-tubulin in HNPC TMAs: absence of staining (A), moderate staining (B), and strong staining (C). Photomicrographs are taken at $\times 20$ objective magnification (A–C) and at $\times 10$ objective magnification (A–C, insets). Scale bar, 100 μ m. D, RFS curves stratified by the expression of β III-tubulin (negativity versus positivity of immunostaining; $P = 0.002$, log-rank test).

LNCaP cells (β III-tubulin clone 1 and β III-tubulin clone 7) were significantly more resistant to docetaxel treatment than control vector-transfected LNCaP cells with a 6.6-fold increase in the IC_{50} (33.1 versus 5.0 nmol/L; $P < 0.001$; Fig. 2D). A significant difference between clones and control cell survival was already achieved at 2 nmol/L docetaxel and persisted up to 50 nmol/L docetaxel treatment ($P < 0.001$). β III-tubulin-transfected LNCaP cells were again poorly sensitive to docetaxel when higher doses were tested (Supplementary Fig. S4). Having established that β III-tubulin has severe implications for docetaxel resistance in LNCaP cells, we sought to determine if this could be due in part to an effect of β III-tubulin on cell proliferation. To this end, cell proliferation was assayed in the absence of drug. Cell doubling times for vector-transfected LNCaP and β III-tubulin transfectants were estimated at 31 and 44 hours, respectively (Supplementary Table S1). Two β III-tubulin-transfected DU145 clones were also selected for subsequent treatment, including one clone expressing high levels of β III-tubulin (clone 7) and one clone expressing moderate β III-tubulin (clone 5) at a level similar to that found in parental or control vector-transfected DU145 cells (Fig. 3A). The cell viability assays showed that β III-tubulin-transfected clone 7 was significantly more resistant to docetaxel treatment compared with clone 5 or control vector-transfected DU145 cells with a 2-fold increase in IC_{50} (11.1 versus 5.1 nmol/L; $P < 0.001$; Fig. 3B). A significant difference in cell viability between clone 7 and control cells was already achieved at 5 nmol/L ($P < 0.001$). There were no noticeable morphologic differences between the parental

vector-transfected DU145 and either of the two sublines. Nor were there any evident differences in growth rates noted during standard passage and cell proliferation assays of the sublines compared with the vector-transfected or parental cells (Supplementary Table S1).

β III-tubulin silencing increases sensitivity to docetaxel

To further ascertain a role for β III-tubulin in chemoresistance to docetaxel, siRNAs directed against β III-tubulin were used to knock down endogenous β III-tubulin expression in 22Rv1 cells. The targeting siRNA with the highest reduction of β III-tubulin was selected for further study based on RT-PCR and Western blot analysis for effects on β III-tubulin mRNA and protein. β III-tubulin mRNA levels were decreased by 70% using this siRNA, and β III-tubulin knockdown was confirmed by Western blot analysis after 3 and 6 days (Fig. 3C). siRNA-mediated loss of β III-tubulin did not seem to affect the other β III-tubulin isotypes (Supplementary Fig. S5). An assessment of the doubling times revealed that concomitantly with the loss of β III-tubulin on β III-tubulin siRNA treatment, there was a trend toward an increase in cell growth (Supplementary Table S1). Docetaxel was then added to the growth medium of control cells or targeting siRNA-treated cells 72 hours after the transfection. Seventy hours later, targeting siRNA-transfected 22Rv1 cells were found to be more sensitive to docetaxel treatment at all doses tested compared with the control 22Rv1 cells. Overall, β III-tubulin siRNA-transfected 22Rv1 cells were found to be 2-fold more sensitive to docetaxel (IC_{50} of 4.4 versus 8.5 nmol/L; $P < 0.001$; Fig. 3D) than controls.

These results indicate that β III-tubulin silencing sensitizes AI PCa cells to docetaxel.

Predictive value of early β III-tubulin expression in a docetaxel-treated patient cohort

By examining the β III-tubulin status in the initial prostatic biopsies of patients subsequently treated for CRPC disease with docetaxel chemotherapy, we investigated the usefulness of β III-tubulin expression as a potential predictive tumor biomarker for response to docetaxel. Of the 37 cases, 17 were positive for β III-tubulin (9 with moderate and 8 with strong staining), whereas 20 were negative. Representative examples

of staining are shown in Fig. 4A and B. In this cohort, β III-tubulin expression was significantly correlated with a Gleason score of >7 at diagnosis; 29.4% of β III-tubulin-negative cancers were graded 8 or more compared with 63.2% of β III-tubulin-positive cancers ($P = 0.043$). PSA responses were observed in 52% of β III-tubulin-negative patients compared with 35% of β III-tubulin-positive patients ($P = 0.337$). Patients with β III-tubulin-positive tumors experienced shorter time to progression. Median time to progression was 4.7 months in β III-tubulin-positive patients compared with 9.8 months in β III-tubulin-negative patients (Breslow $P = 0.149$; log-rank $P = 0.522$).

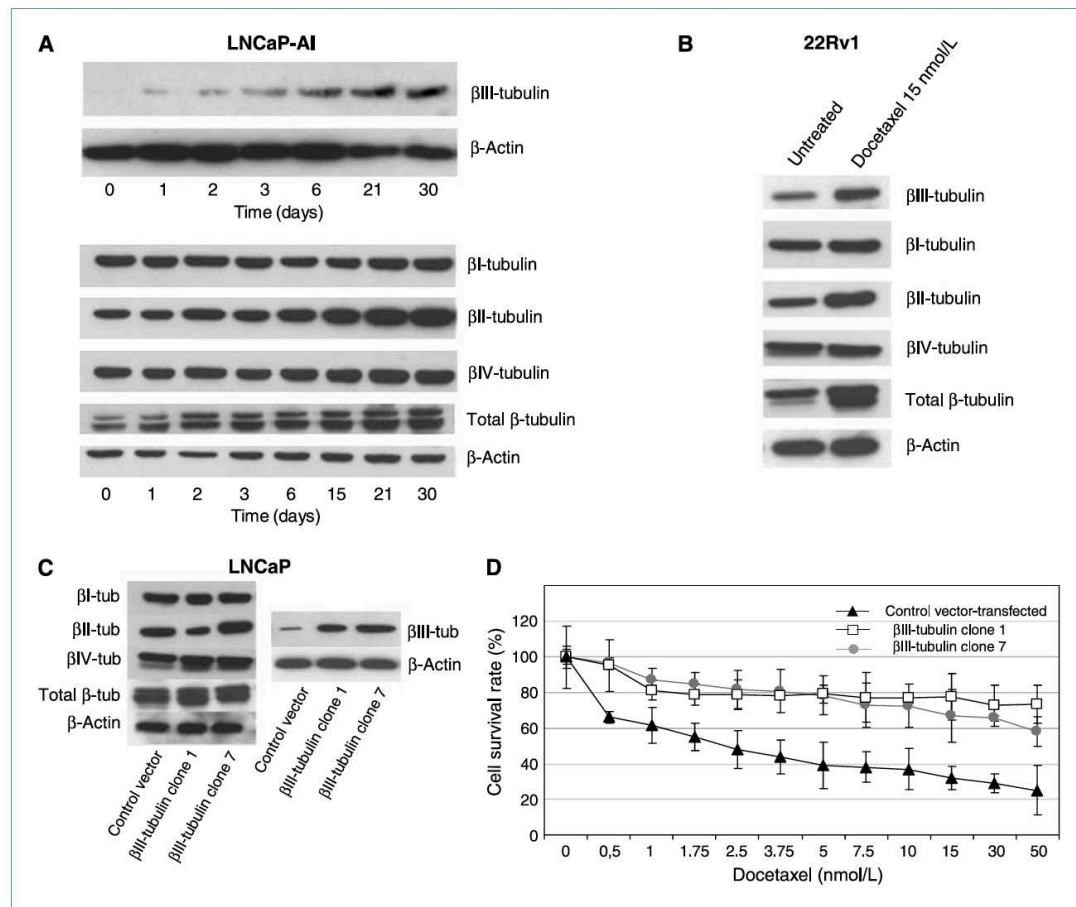


Figure 2. Links between β III-tubulin expression and the acquisition of docetaxel resistance in androgen-sensitive and androgen-insensitive PCa cells. A, time course expression of β III-tubulin, total β -tubulin, and β -tubulin isotypes in LNCaP-AI cells cultivated at 3 nmol/L docetaxel. B, increased protein expression was confirmed by Western blotting: untreated 22Rv1 compared with 22Rv1 cultivated in the presence of 15 nmol/L docetaxel. C, differential expression of β III-tubulin between control vector-transfected cells and β III-tubulin-transfected clones was assessed by immunoblotting. A significant increase in levels of β III-tubulin protein was observed in the β III-tubulin-transfected LNCaP cells (β III-tubulin clone 1 and β III-tubulin clone 7) compared with the control vector-transfected LNCaP cells. D, dose-response curve assessing the effect of β III-tubulin overexpression in LNCaP cells. Cell viability assays showed that β III-tubulin-transfected LNCaP cells (clones 1 and 7) were significantly more resistant to docetaxel treatment than control vector-transfected LNCaP cells. Points, mean; bars, SE.

Overall, the median survival time for the entire cohort was 25.3 months (95% CI, 16.5–34.2), and the observed cumulative probabilities at years 1, 2, and 3 were 79.5%, 57.8%, and 43.7%, respectively. Median OS was significantly shorter for patients with β III-tubulin–positive tumors than those with β III-tubulin–negative hormone-naive tumors (13.5 versus 41.6 months; $P = 0.019$; Fig. 4C). Finally, baseline PSA levels measured before the first cycle of chemotherapy in these patients were also significantly related to OS. Multivariate analysis taking β III-tubulin expression, baseline PSA, age, and duration of androgen deprivation therapy into account showed that β III-tubulin expression (HR, 2.93; $P = 0.037$) and baseline PSA level (HR, 4.09; $P = 0.012$) were independent predictors of OS.

Discussion

In PCa, clinical data and histoprognostic parameters, separated or integrated into nomograms, still fail at the individual level to accurately determine the risk of biochemical or clinical relapse after local treatment (33, 34). At CRPC stage, docetaxel-based chemotherapy has proven to have some effectiveness in terms of overall response rates and survival in CRPC patients (4, 5). However, any selection of patients likely to benefit most from this form of chemotherapy is difficult and is often based simply on patient age or the presence of comorbidities in individuals.

Numerous preclinical studies have reported that the selective overexpression of β III-tubulin constitutes an important

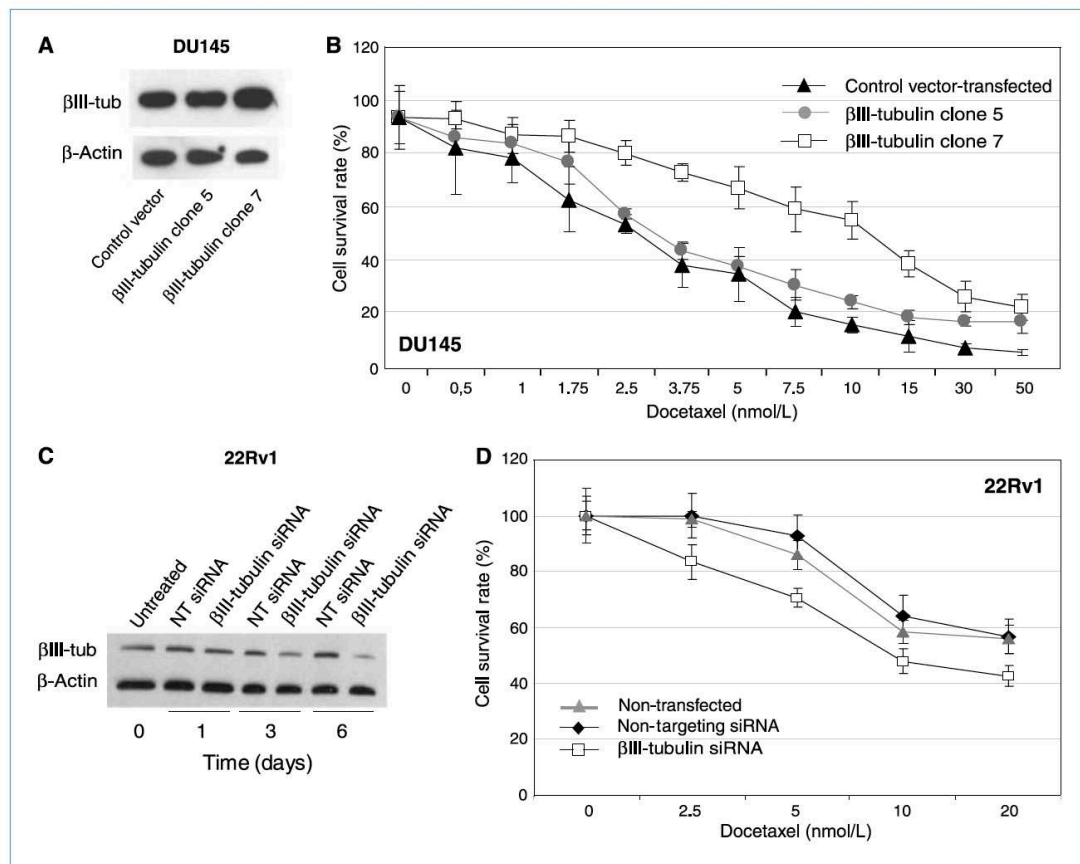


Figure 3. Functional overexpression and knockdown of β III-tubulin modulates the AI PCa cell sensitivity to docetaxel. A, differential levels of β III-tubulin protein between control vector– and β III-tubulin–transfected (clones 5 and 7) DU145 cells: Western blot analysis showed that the β III-tubulin clone 5 expressed a similar level of β III-tubulin compared with control vector–transfected cells, whereas the β III-tubulin clone 7 showed a higher level of β III-tubulin expression. B, dose-response curve assessing the effect of β III-tubulin overexpression in AI DU145 cells. Cell viability assays showed that clone 7 was significantly more resistant to docetaxel treatment relative to β III-tubulin clone 5 and control vector–transfected DU145 cells. Points, mean; bars, SE. C, Western blot confirmation of β III-tubulin knockdown in 22Rv1 cells after siRNA transfection. The β III-tubulin protein level was decreased 72 h after transfection and lasted at least 6 d after a single transfection. NT, nontargeting. D, dose-response curve assessing the effect of β III-tubulin silencing in AI 22Rv1 cells. Cell viability assays showed that β III-tubulin siRNA–transfected 22Rv1 cells were significantly more sensitive to docetaxel treatment relative to nontargeting siRNA–transfected and nontransfected 22Rv1 cells. Points, mean; bars, SE.

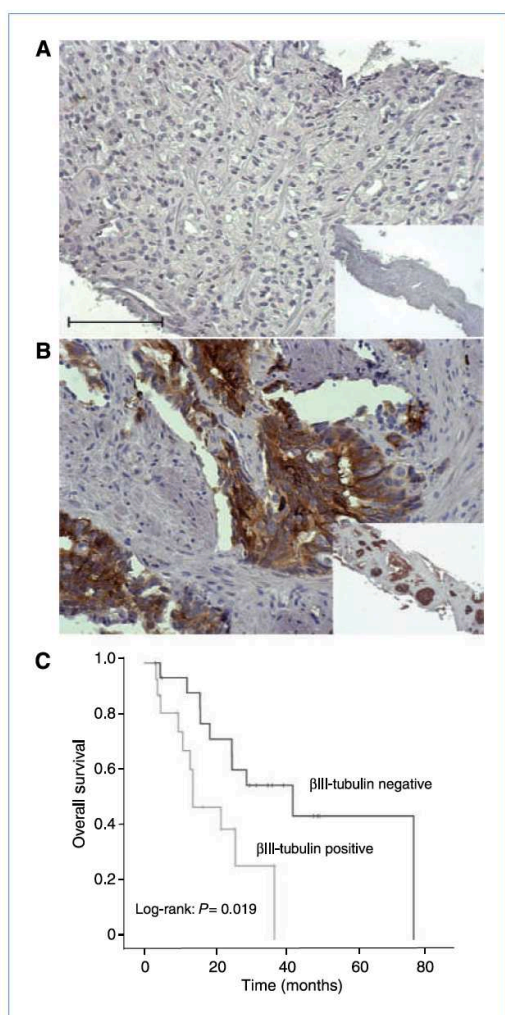


Figure 4. Predictive value of β III-tubulin expression for response to docetaxel in CRPC patients. A and B, representative staining for β III-tubulin in prostate biopsy cores: absence of staining (A) and staining positivity (B). Photomicrographs are taken at $\times 20$ objective magnification (A and B) and at $\times 5$ objective magnification (A and B, insets). Scale bar, 100 μ m. C, OS in docetaxel-treated patients: stratification by β III-tubulin expression in prostatic tissue (negativity versus positivity of immunostaining; $P = 0.019$, log-rank test). Expression of β III-tubulin in PCa tissue is significantly predictive for poorer survival in docetaxel-treated patients.

mechanism for resistance to tubulin-binding agents in various cancer cell lines (19, 35–38). Several clinical studies have shown that high levels of β III-tubulin expression in tumor cells are associated with low response rates and poorer survival in patients treated with taxane-based chemotherapies (13–17, 39). Our findings in PCa were consistent with the previous studies and highlight that the expression of

β III-tubulin is associated with non-organ-confined disease, metastatic lymph nodes, and PSA failure. Thus, tumor cell β III-tubulin expression might characterize a general subclass of PCa patients with aggressive behavior and poor prognosis. This could give reason to consider adjuvant treatments for patients with β III-tubulin-positive tumors.

Characteristics of our HNPC patient's cohort differed slightly from characteristics of patients who actually undergo a radical prostatectomy. The advent of PSA testing has led to a considerable stage migration with an increase of low-risk PCa. In our HNPC cohort study, we included patients who underwent radical prostatectomy since 1988. This constitutes a selection bias due to a more important proportion of high-risk PCa before the PSA era. These discrepancies may limit the study of β III-tubulin expression, as the number of high-risk PCa decreases over time. However, we showed that the prognostic effect of β III-tubulin remained significant in organ-confined PCa, and therefore, we posit that the β III-tubulin is of additional value to well-established histoprognotic parameters even in the assessment of presumed low-risk PCa.

We also observed here that the β III-tubulin expression in AI PCa cell lines was increased in response to acute or chronic exposure to docetaxel. In line with our findings, Ranganathan and colleagues (19) previously showed an increase in β III-tubulin expression in response to paclitaxel treatment of DU145 cells. The exact mechanism by which increased expression of β III-tubulin mediates drug resistance remains open to debate. In some instances, we found that alterations of β III-tubulin expression were associated with changes in cell morphology and/or cell proliferation rate. Thus, there is reason to believe that these events might be key determinants of drug resistance. Additionally, evidence is accumulating that microtubules containing β III-tubulin exhibit an aberrant dynamicity. These microtubules are less stable than microtubules composed of other β -tubulin isotypes (9, 10, 40, 41). Because the primary effect of taxane is to bind microtubules, thereby enhancing the microtubule polymerization and decreasing microtubule dynamicity, it has been suggested that β III-tubulin-containing microtubules are more prone to overcome the suppressive effects of taxanes on microtubule dynamics. Although it should be noted that all the above studies (12, 13, 42) have focused on the assembly of purified microtubules in cell-free systems and therefore remain controversial given contradictory reports obtained in intact cells, and hence more biologically relevant, that β III-tubulin did not intrinsically affect microtubule dynamic, at least in some instances (38, 43). Interestingly, in these last studies, the effects of paclitaxel on microtubule dynamics were altered, suggesting a role for β III-tubulin in drug-microtubule interactions. Consistent with this, Mozzetti and colleagues (42) have reported that β III-tubulin overexpression was the prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients compared with other mechanisms of drug resistance such as overexpression of MDR-1 and point mutations in tubulin at the binding site of paclitaxel. Although many studies have focused on paclitaxel, such characteristics might also be pertinent for docetaxel. Interestingly, recent reports further showed that

β III-tubulin confers resistance to microtubule-destabilizing agents such as vinorelbine in breast cancer cells (44). In the setting of non-small cell lung cancer, β III-tubulin was shown to affect significantly the response to both tubulin-targeting agents and DNA-damaging agents (45). The investigators proposed that β III-tubulin may serve as a survival factor to rescue tumor cells from death signals triggered by chemotherapeutic agents. Therefore, it is conceivable that elevated expression of β III-tubulin can exert similar effects in other malignancies, including PCa, and future work should explore this question.

Another interesting open question about anti-microtubule drug resistance associated with changes in β III-tubulin expression in cancer cells is: what is the contribution of other isotypes in response to taxane-based regimens? Ranganathan and colleagues (20) have previously noted that class IVb β -tubulin was increased collaterally in β III-tubulin-transfected DU145 cells in response to paclitaxel treatment. In a separate study, wherein paclitaxel-resistant DU145 variants were selected after chronic exposure to the drug, examination of the β -tubulin isotype composition revealed increased expression of β III-tubulin, but no changes were observed for IVb β -tubulin. Instead, some increase in IVa β -tubulin expression was noted (19). Although this previous work in DU145 has suggested that β III-tubulin expression is upregulated in response to paclitaxel treatment, our survey using docetaxel treatment of two AI AR-positive PCa cells, 22Rv1 and LNCaP-AI, provides additional evidence that this situation might be relevant in clinical settings. These studies further indicate that expression of the class β II tubulin can be altered in PCa cells, and highlight a potential role for this isotype in the emergence of docetaxel resistance. The ectopic overexpression or silencing of β III-tubulin resulted in a seeming specific upregulation or downregulation of the β II-tubulin expression, respectively. Surprisingly, under these conditions, we failed to find any significant changes in the expression of other β -tubulin isotypes. These instances strengthened the role of β III-tubulin in contributing to chemosensitivity and illustrate the importance of monitoring the β -tubulin isotype profile to confirm the contribution of the target isotype in drug response studies. Although previous work has suggested that manipulation of β II- and β IVb-tubulin expression did not cause changes in paclitaxel sensitivity of Chinese hamster ovary and lung cancer cells (46, 47), these cell lines differ from PCa cells, and future work is warranted to determine the full functional implications of each β -tubulin isotype in the emergence of drug resistance in PCa cells.

Our findings in experimental PCa cell lines were consistent with our clinical observations that β III-tubulin expression in prostate tumors correlated significantly with outcomes of docetaxel chemotherapy for CRPC patients. Patients expressing β III-tubulin at diagnosis had reduced survival. Thus, it is tempting to speculate that the assessment of β III-tubulin expression could determine which CRPC patients might benefit from taxane-based chemotherapy. Studies exploring potential molecular markers in response to chemotherapy are currently limited by the difficulty in obtaining tissues from patients with CRPC. Many changes occur during the evolu-

tion to CRPC, and cancer tissue at diagnosis does not always reflect accurately the cancer tissue in its more advanced stage. In fact, obtaining tumor tissue at CRPC stage, or before and during therapy, although rarely feasible in clinical practice, would certainly be the best way to investigate the effect of biomarker on response to therapy. Nevertheless, by examining β III-tubulin expression in the tumors of HNPC patients, which are easily accessible to tumor sampling, it seems possible to evaluate their response to docetaxel-based therapy once the disease has progressed to CRPC. If these findings are confirmed, the use of novel tubulin-targeted agents, such as epothilones, could be useful for β III-tubulin-positive PCa patients (11, 48, 49). This might also offer the opportunity for therapeutic intervention by an anti- β III-tubulin treatment in such patients.

Collectively, our results suggest that the functional and clinical biomarker aspects of β III-tubulin expression are linked. Consistent with our previous findings and other studies reporting an increase in the β III-tubulin isotype as a result of anti-microtubule drug treatments (19, 20, 50), it seems likely that adjuvant treatments other than the current taxane-based chemotherapy regimen may be required for this group of patients. More importantly, our results now support the idea that β III-tubulin expression may be linked to multiple forms of PCa: progression to recurrence in HNPC patients, progression to CRPC in hormone-treated patients, and, finally, progression to docetaxel resistance in docetaxel-treated CRPC patients. In the area of cancer treatment, clinicians have to deal with two limitations: the difficulty to predict accurately the relapse after local treatment, and the ability to anticipate ineffective adjuvant or systemic therapy. To date, in PCa, new molecular markers are needed to better define the subset of patients who are most likely to benefit from an adjuvant strategy after radical treatment, and from chemotherapy at CRPC stage. Our findings were consistent with the role of β III-tubulin expression as prognostic marker of biochemical recurrence at HNPC stage. Assessment of the β III-tubulin expression in cancer tissue therefore could be useful to identify and monitor PCa at high risk for recurrence after radical prostatectomy. If longer follow-up and rates of specific mortality confirm these results, the β III-tubulin expression might be interesting for predicting recurrence rates and for proposing adjuvant therapy.

Functional overexpression or knockdown of β III-tubulin modulates the PCa cell line sensitivity to docetaxel. The tissue β III-tubulin expression status also has predictive value in terms of OS in patients receiving docetaxel-based chemotherapy for hormone-independent disease. These findings underline the importance of β III-tubulin expression, which could be used in addition to clinicopathologic characteristics to select patients for docetaxel-based chemotherapy. Prospective studies incorporating β III-tubulin immunohistochemistry are warranted to determine the clinical relevance of routine use of this assay.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Grant Support

INSERM, "Conseil Général du Val de Marne", "Université Paris-Est Créteil Val de Marne", ARTP (G. Ploussard, S. Terry, and F. Vacherot), "Association pour la Recherche sur le Cancer" (G. Ploussard and F. Vacherot), and FERCM (G. Ploussard).

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225–49.
- Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, et al. Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *J Clin Oncol* 2006;24:3973–8.
- Attar RM, Takimoto CH, Gottardis MM. Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. *Clin Cancer Res* 2009;15:3251–5.
- Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1513–20.
- Tannock IF, de Wit R, Berry WR, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1502–12.
- Bamias A, Bozas G, Antoniou N, et al. Prognostic and predictive factors in patients with androgen-independent prostate cancer treated with docetaxel and estramustine: a single institution experience. *Eur Urol* 2008;53:323–31.
- Yoshino T, Shiina H, Urakami S, et al. Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:6116–24.
- Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol* 1999;17:1061–70.
- Lu Q, Luduena RF. Removal of β III isotype enhances taxol induced microtubule assembly. *Cell Struct Funct* 1993;18:173–82.
- Panda D, Miller HP, Banerjee A, Luduena RF, Wilson L. Microtubule dynamics *in vitro* are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11358–62.
- Sabbatini P, Spriggs DR. Epothilones: better or more of the same? *J Clin Oncol* 2009;27:3079–81.
- Seve P, Dumontet C. Is class III β -tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol* 2008;9:168–75.
- Ferrandina G, Zannoni GF, Martinelli E, et al. Class III β -tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:2774–9.
- Galmarini CM, Treilleux I, Cardoso F, et al. Class III β -tubulin isotype predicts response in advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or docetaxel. *Clin Cancer Res* 2008;14:4511–6.
- Seve P, Reiman T, Isaac S, et al. Protein abundance of class III β -tubulin but not $\Delta 2$ - α -tubulin or tau is related to paclitaxel response in carcinomas of unknown primary site. *Anticancer Res* 2008;28:1161–7.
- Seve P, Mackey J, Isaac S, et al. Class III β -tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. *Mol Cancer Ther* 2005;4:2001–7.
- Urano N, Fujiwara Y, Doki Y, et al. Clinical significance of class III β -tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer. *Int J Oncol* 2006;28:375–81.
- Seve P, Lai R, Ding K, et al. Class III β -tubulin expression and benefit from adjuvant cisplatin/vinorelbine chemotherapy in operable non-small cell lung cancer: analysis of NCIC JBR.10. *Clin Cancer Res* 2007;13:994–9.
- Ranganathan S, Benetatos CA, Colarusso PJ, Dexter DW, Hudes GR. Altered β -tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* 1998;77:562–6.
- Ranganathan S, McCauley RA, Dexter DW, Hudes GR. Modulation of endogenous β -tubulin isotype expression as a result of human β (III) cDNA transfection into prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* 2001;85:735–40.
- Terry S, Ploussard G, Allory Y, et al. Increased expression of class III β -tubulin in castration-resistant human prostate cancer. *Br J Cancer* 2009;101:951–6.
- Horszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1983;43:1809–18.
- Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res* 2008;68:5469–77.
- van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 2003;57:205–25.
- Azoulay S, Terry S, Chimingqi M, et al. Comparative expression of Hedgehog ligands at different stages of prostate carcinoma progression. *J Pathol* 2008;216:460–70.
- Frigo DE, McDonnell DP. Differential effects of prostate cancer therapeutics on neuroendocrine transdifferentiation. *Mol Cancer Ther* 2008;7:659–69.
- Ranganathan S, Salazar H, Benetatos CA, Hudes GR. Immunohistochemical analysis of β -tubulin isotypes in human prostate carcinoma and benign prostatic hypertrophy. *Prostate* 1997;30:263–8.
- Bubley GJ, Carducci M, Dahut W, et al. Eligibility and response guidelines for phase II clinical trials in androgen-independent prostate cancer: recommendations from the Prostate-Specific Antigen Working Group. *J Clin Oncol* 1999;17:3461–7.
- Sramkoski RM, Pretlow TG II, Giaconia JM, et al. A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999;35:403–9.
- Mickey DD, Stone KR, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Characterization of a human prostate adenocarcinoma cell line (DU 145) as a monolayer culture and as a solid tumor in athymic mice. *Prog Clin Biol Res* 1980;37:67–84.
- Cindolo L, Cantile M, Vacherot F, Terry S, de la Taille A. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: from lab to bedside. *Urol Int* 2007;79:287–96.
- Yuan TC, Veeramani S, Lin MF. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:531–47.
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 1998;280:969–74.
- Waiz J, Chun FK, Klein EA, et al. Nomogram predicting the probability of early recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Urol* 2009;181:601–7; discussion 607–8.
- Burkhardt CA, Kavallaris M, Band Horwitz S. The role of β -tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs. *Biochim Biophys Acta* 2001;1471:O1–9.
- Kavallaris M, Burkhardt CA, Horwitz SB. Antisense oligonucleotides to class III β -tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br J Cancer* 1999;80:1020–5.
- Akasaka K, Maesawa C, Shibasaki M, et al. Loss of class III β -tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2009;129:1516–26.
- Kamath K, Wilson L, Cabral F, Jordan MA. β III-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *J Biol Chem* 2005;280:12902–7.

39. Seve P, Isaac S, Tredan O, et al. Expression of class III β -tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:5481–6.
40. Derry WB, Wilson L, Khan IA, Luduena RF, Jordan MA. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified β -tubulin isotypes. *Biochemistry* 1997; 36:3554–62.
41. Hari M, Yang H, Zeng C, Canizales M, Cabral F. Expression of class III β -tubulin reduces microtubule assembly and confers resistance to paclitaxel. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;56:45–56.
42. Mozzetti S, Ferlini C, Concolino P, et al. Class III β -tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005;11:298–305.
43. Gan PP, McCarroll JA, Po'uha ST, Kamath K, Jordan MA, Kavallaris M. Microtubule dynamics, mitotic arrest, and apoptosis: drug-induced differential effects of β III-tubulin. *Mol Cancer Ther* 2010;9:1339–48.
44. Stengel C, Newman SP, Leese MP, Potter BV, Reed MJ, Purohit A. Class III β -tubulin expression and *in vitro* resistance to microtubule targeting agents. *Br J Cancer* 2010;102:316–24.
45. Gan PP, Pasquier E, Kavallaris M. Class III β -tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer. *Cancer Res* 2007;67:9356–63.
46. Blade K, Menick DR, Cabral F. Overexpression of class I, II or IVb β -tubulin isotypes in CHO cells is insufficient to confer resistance to paclitaxel. *J Cell Sci* 1999;112:2213–21.
47. Gan PP, Kavallaris M. Tubulin-targeted drug action: functional significance of class II and class IVb β -tubulin in vinca alkaloid sensitivity. *Cancer Res* 2008;68:9817–24.
48. Thomas E, Tabernero J, Fournier M, et al. Phase II clinical trial of ixabepilone (BMS-247550), an epothilone B analog, in patients with taxane-resistant metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25: 3399–406.
49. Hussain A, DiPaola RS, Baron AD, Hígano CS, Tchekmedyan NS, Johri AR. Phase II trial of weekly patupilone in patients with castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 2009;20:492–7.
50. Ranganathan S, Dexter DW, Benetatos CA, Chapman AE, Tew KD, Hudes GR. Increase of β (III)- and β (IVa)-tubulin isotypes in human prostate carcinoma cells as a result of estramustine resistance. *Cancer Res* 1996;56:2584–9.

- Publication 3 -

Prostate cancer antigen 3 score accurately predicts tumour volume and might help in selecting prostate cancer patients for active surveillance

Ploussard G., Durand X., Xylinas E., Moutereau S., Radulescu C., Forgue A., Nicolaiew N., Terry S., Allory Y., Loric S., Salomon L., Vacherot, F. and de la Taille A.

European Urology. 2011 Mar;59(3):422-9

Présentation de la publication 3

La sélection optimale des patients atteints de CaP localisés et candidats à la surveillance active fait encore débat, notamment en raison du risque de maladie extra-prostatique non diagnostiquée malgré des critères stricts initiaux de sélection. Ce risque de méconnaître une maladie agressive est évaluée à environ 20% dans la littérature.

L'objectif de cette troisième publication était d'évaluer l'impact du score urinaire PCA3 comme critère de sélection à une attitude de surveillance active parmi une cohorte de patients opérés, répondant aux critères de CaP localisés à faible risque (score de Gleason 6 ; PSA < 10 ; stade clinique T1c). Cent-six patients consécutifs ont ainsi subi un test urinaire PCA3 de manière prospective avant la prostatectomie totale.

Le score PCA3 était fortement corrélée au volume de la tumeur sur la pièce de prostatectomie dans une analyse en régression linéaire ($p < 0,001$, $r = 0.409$). Le risque d'avoir un cancer $> 0,5$ cm³ et un CaP significatif (selon les critères actualisés d'Epstein) était multiplié par trois chez les hommes avec un score PCA3 de > 25 par rapport aux hommes ayant un score PCA3 < 25 . Il y avait une tendance vers des scores PCA3 plus élevés parmi les patients atteints de CaP avec score de Gleason élevé et atteinte extracapsulaire. Dans une analyse multivariée prenant en compte chaque critère de sélection (critères biopsiques, données de l'IRM pré-opératoire, score urinaire PCA3), un score PCA3 > 25 était un facteur prédictif indépendant de volume tumoral $> 0,5$ cm³ (odds ratio [OR]: 5,4, $p = 0,010$) et de CaP significatif (OR: 12,7 $p = 0,003$). Les critères biopsiques et les résultats de l'IRM étaient quant à eux significativement associés au risque d'avoir un CaP avec score de Gleason élevé et atteinte extracapsulaire (OR: 3,9 et 5,0, respectivement, $p = 0,030$ et $p = 0,025$, respectivement).

Le test urinaire PCA3 est donc un marqueur pronostique utile pour améliorer la sélection des patients candidats à une attitude de surveillance active, en plus des critères habituellement retenus. Avec un seuil de 25, le score de PCA3 est ainsi fortement indicatif d'un faible volume tumoral et de la présence d'un CaP non significatif.



Prostate Cancer

Prostate Cancer Antigen 3 Score Accurately Predicts Tumour Volume and Might Help in Selecting Prostate Cancer Patients for Active Surveillance

Guillaume Ploussard^{*a,c,1}, Xavier Durand^{a,c,1}, Evanguelos Xylinas^{a,c}, Stéphane Moutereau^{a,c}, Camélia Radulescu^a, Aurélien Forgue^b, Nathalie Nicolaiew^c, Stéphane Terry^c, Yves Allory^{a,c}, Sylvain Loric^{a,c}, Laurent Salomon^{a,c}, Francis Vacherot^c, Alexandre de la Taille^{a,c}

^a Department of Urology, Pathology and Biochemistry, CHU Henri Mondor, APHP, Créteil, France

^b Department of Urology, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

^c INSERM U955 Equipe 7, Université Paris Val-de-Marne, Créteil, France

Article info

Article history:

Accepted November 30, 2010

Published online ahead of print on December 8, 2010

Keywords:

Prostate cancer
Active surveillance
Prostate cancer antigen 3
Low risk
Radical prostatectomy
Insignificant

Abstract

Background: The optimal selection of prostate cancer (PCa) patients for active surveillance (AS) is currently being debated.

Objective: To assess the impact of urinary prostate cancer antigen 3 (PCA3) score as an AS criterion instead of and in addition to the current criteria.

Design, setting, and participants: We prospectively studied 106 consecutive low-risk PCa patients (prostate-specific antigen [PSA] ≤ 10 ng/ml, clinical stage T1c–T2a, and biopsy Gleason score 6) who underwent a PCA3 urine test before radical prostatectomy (RP).

Measurements: Performance of AS criteria (biopsy criteria, PCA3 score, PSA density, and magnetic resonance imaging [MRI] findings) was tested in predicting four prognostic pathologic findings in RP specimens: (1) pT3–4 disease; (2) overall unfavourable disease (OUD) defined by pT3–4 disease and/or pathologic primary Gleason pattern 4; (3) tumour volume < 0.5 cm³; and (4) insignificant PCa.

Results and limitations: The PCA3 score was strongly correlated with the tumour volume in a linear regression analysis ($p < 0.001$, $r = 0.409$). The risk of having a cancer ≥ 0.5 cm³ and a significant PCa was increased three-fold in men with a PCA3 score of ≥ 25 compared with men with a PCA3 score of < 25 with most AS biopsy criteria used. There was a trend towards higher PCA3 scores in patients with unfavourable and non-organ-confined disease and Gleason > 6 cancers. In a multivariate analysis taking into account each AS criterion, a high PCA3 score (≥ 25) was an important predictive factor for tumour volume ≥ 0.5 cm³ (odds ratio [OR]: 5.4; $p = 0.010$) and significant PCa (OR: 12.7; $p = 0.003$). Biopsy criteria and MRI findings were significantly associated with OUD (OR: 3.9 and 5.0, respectively; $p = 0.030$ and $p = 0.025$, respectively).

Conclusions: PCA3 score may be a useful marker to improve the selection for AS in addition to the current AS criteria. With a predictive cut-off of 25, PCA3 score is strongly indicative for tumour volume and insignificant PCa.

© 2010 European Association of Urology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

¹ These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. INSERM U955 Eq07 Department of Urology, CHU Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil, France. Tel. +33149812254; Fax: +33149812568. E-mail address: g.ploussard@gmail.com (G. Ploussard).

1. Introduction

Active surveillance (AS) is a strategy for managing patients expectantly with the intention to treat if signs of progression emerge [1,2]. Nomograms predicting insignificant prostate cancer (PCa) have been developed, validated, and updated [3]. However, some men are classified with indolent disease although they have truly significant cancer [4,5]. Published AS series have used different criteria, largely based on centre experiences, with no hard data. The most common AS criteria are Gleason score ≤ 6 , prostate-specific antigen (PSA) ≤ 10 ng/ml, and clinical stage T1–T2a disease [6–8]. The most stringent AS criteria have recently been reported in a French prospective trial including patients with a tumour length per core of <3 mm in fewer than three cores [9]. Studies comparing entry criteria for AS protocols emphasised the risk of misclassification and the limitations of currently available AS criteria [4,10]. Recent studies of repeat biopsies in men under AS have emphasised the risk of encountering upgraded and/or upstaged disease on the second pathologic assessment [11,12]. The inclusion of patients in AS protocols emphasises the necessity of perfectly accurate staging strategies. To date, a limited number of studies have assessed the yield of PCA3 in AS protocols [13]. Although the PCA3 score has become an increasing diagnostic tool for the selection of biopsy candidates, this predictive value has not been thoroughly assessed among PCa patients eligible for AS or for the characterisation of low-volume PCa [14–16].

In this paper, we aimed to assess, in a prospective study, the impact of urinary PCA3 score in predicting the pathologic findings after radical prostatectomy (RP) in low-risk PCa patients and to determine selection value instead of or in addition to the current AS biopsy criteria.

2. Materials and methods

2.1. Patient cohort

Between February 2009 and June 2010, 106 low-risk PCa patients who underwent RP for localised PCa at two French urological centres (Créteil, Bordeaux) were tested for urinary PCA3 score before surgery. The biopsy core number depended on the institution and was comparable for all patients from the same centre. Low-risk PCa was defined as PSA ≤ 10 ng/ml, clinical stage T1c–T2a, and biopsy Gleason score 6. Clinicopathologic parameters were collected in a prospective manner. Each magnetic resonance imaging (MRI) examination was performed at least 6 wk after the prostate biopsies. MRI studies were performed on a 1.5-T whole-body magnetic resonance scanner using a balloon-design endorectal coil inflated with 80 ml of air. Conventional T2-weighted fast-spin echo images were obtained in three orthogonal planes and 3-mm slice thickness.

All RP specimens were evaluated by the same genitourinary pathologist. Briefly, the gland was fixed in 10% formalin, paraffin embedded, and sectioned at 3-mm intervals before whole sections were mounted on slides. A complete sampling procedure was performed. The apical portion, the basis, and the neck of the prostate were separated from the rest of the gland and sampled with a cone technique. Tumours were graded using the Gleason grading system (International Society of Urological Pathology revised version) and staged using the TNM classification. Each focus was outlined on the histologic slices, and

volume was determined using the following formula: $0.4 \times \text{length} \times \text{width} \times \text{cross-section thickness}$. This estimation has been previously validated [17]. The total tumour volume was obtained by adding volumes of the three most important cancer foci involving the prostate.

2.2. Prostate cancer antigen 3 urine test

First-catch urine specimens were immediately collected after attentive digital rectal examination (DRE), consisting of three strokes on each prostatic lobe, and were stored in a Progensa urine specimen transport kit. Collection was performed the day before RP. Interval between biopsies and RP was at least 3 mo. PCA3 and PSA messenger RNA (mRNA) were isolated using a capture oligonucleotide amplified by the transcription-mediated amplification process and then measured with the Progensa hybridization protection assay. The PCA3 score was calculated as the ratio between PCA3 mRNA and PSA mRNA and was considered relatively constant in normal and cancerous prostate cells.

2.3. Study end point

We assessed the performance of AS criteria in predicting four prognostic pathologic findings in RP specimens: (1) pT3–pT4 disease; (2) overall unfavourable disease (OUD), defined by pT3–4 disease and/or pathologic primary Gleason pattern 4; (3) tumour volume <0.5 cm³; and (4) insignificant PCa. Insignificant PCa was defined by the Epstein criteria as organ confined, no Gleason pattern 4 or 5, and tumour volume <0.5 cm³ [18]. In univariate and multivariate models, we tested the following AS criteria: (1) $<33\%$ of positive cores; (2) fewer than three positive cores; (3) fewer than three positive cores and <3 mm of cancer involvement per core; (4) PCA3 score with four cut-offs (<25 , <35 , <50 , and <80); (5) PSA density <0.15 ng/ml per gram; and (6) T1–2 disease on MRI findings. PSA density is a current selection criterion reported in AS programs [19]. We chose to incorporate MRI findings because recent findings suggested that new models that combined clinical and biopsy data with MRI performed better than the clinical models for predicting the probability of insignificant disease in RP specimens [20]. In a secondary analysis, the impact of PCA3 score was evaluated in more restricted cohorts defined by the three different current biopsy criteria previously cited (ie, $<33\%$ of positive cores, fewer than three positive cores, fewer than three positive cores and <3 mm of cancer involvement per core).

2.4. Statistical analyses

Correlations between each AS criterion and the pathologic findings in RP specimens were studied. The qualitative data were tested using a χ^2 test or Fisher exact test as appropriate, and continuous data were tested using the student *t* test. The Mann-Whitney test was used in the absence of a normal distribution. The most significant biopsy criterion, the most significant PCA3 score cut-off, the PSA density, and the MRI findings were then tested in a multivariate model using a logistic regression. Odds ratios (ORs) were calculated with their 95% confidence intervals. Receiver operating characteristic-derived area under the curve (AUC) estimates was used to quantify the predictive accuracy of the PCA3 score in predicting pathologic findings in RP specimens.

3. Results

3.1. Patient cohort

Clinicobiologic parameters of the low-risk patient cohort are listed in Table 1.

Table 1 – Characteristics of the patient cohort

Characteristics	n = 106
Age, yr	
Mean	62.0
Median (range)	62.0 (43–75)
PSA, ng/ml	
Mean	5.96
Median (range)	5.39 (1.8–10.0)
PSA density, ng/ml per gram	
Mean	0.140
Median (range)	0.130 (0.04–0.33)
PSA density <0.15, %	40.8
Free-to-total PSA, %	
Mean	16.7
Median (range)	14.0 (6–40)
Prostate weight, g	
Mean	40.5
Median (range)	40.0 (15–95)
Clinical stage, %	
T1c	86.8
T2a	13.2
MRI findings, %	
T1–2	84.4
T3	15.6
PCA3 score	
Mean	54.3
Median (range)	34.5 (3–379)
Percent of men eligible for AS, %	
Function of PCA3 cut-off:	
PCA3 score <25	28.3
PCA3 score <35	51.9
PCA3 score <50	66.0
PCA3 score <80	79.2
Function of biopsy criteria:	
<33% of positive cores (group 1)	77.4
Fewer than three positive cores (group 2)	52.8
Fewer than three positive cores <3 mm (group 3)	44.3

AS = active surveillance; MRI = magnetic resonance imaging; PCA3 = prostate cancer antigen 3; PSA = prostate-specific antigen.

The percent of men eligible for AS based on function of the criterion selected are also shown. This rate ranged from 28.3% to 79.2%, according to the selected cut-off (25, 35, 50, or 80) when the PCA3 score was chosen as an AS criterion. When more current biopsy criteria were used, this rate ranged from 44.3% to 77.4%. Non-organ-confined disease was suspected by MRI findings (T3) in 15.6% of men.

Pathologic findings in biopsy and RP specimens are listed in Table 2. Median number of positive cores was two, and median maximal tumour length per core was 2 mm. In RP specimens, pT3 disease was reported in 23.6% of cases. A primary Gleason 4 pattern was found in 11.3% of cases. Mean and median tumour volumes were 3.0 cm³ and 0.9 cm³, respectively.

The PCA3 score was strongly correlated with the tumour volume in a linear regression analysis ($p < 0.001$, $r = 0.409$; Fig. 1). Univariate and multivariate correlations between PSA, PCA3 score, prostate volume, and tumour volume are shown in Table 3. The mean PCA3 score was higher in patients with OUD (62.5 vs 51.5 in favourable disease;

Table 2 – Biopsy and radical prostatectomy pathologic findings of the cohort

Biopsy findings	n = 106
Biopsy cores	
Mean	17.8
Median (range)	21.0 (12–24)
Positive cores	
Mean	3.6
Median (range)	2.0 (1–14)
Percent of cancer per core, %	
Mean	20.0
Median (range)	14.3 (4.7–66.6)
Maximal tumour length per core, mm	
Mean	3.0
Median (range)	2.0 (1–12)
Gleason score, %	
3 + 3	100.0
Radical prostatectomy findings pTNM, %	
pT0	0.9
pT2	75.5
pT3	23.6
Gleason score; %	
3 + 3	58.4
3 + 4	30.3
4 + 3	11.3
Overall unfavourable disease*, %:	27.4
Tumour volume, cm ³	
Mean	3.0
Median (range)	1.9 (0–15.4)
Tumour volume <0.5 cm ³ , %	21.7
Insignificant PCa**, %:	18.9

PCa = prostate cancer.
* pT3 and/or primary Gleason pattern 4.
** Organ confined, no Gleason pattern 4 or 5, and tumour volume <0.5 cm³.

$p = 0.378$), with Gleason 7–10 cancers (66.7 vs 45.4 in Gleason 6 cancers; $p = 0.066$), with primary Gleason pattern 4 cancers (79.1 vs 51.1 in primary Gleason pattern 3 cancers; $p = 0.104$), and with tumour volume ≥ 0.5 cm³ (58.7 vs 38.3 in cancer with tumour volume <0.5 cm³; $p = 0.142$; median values: 42 vs 23). The mean PCA3 score was higher in patients with significant disease compared with patients with insignificant disease (organ confined, no Gleason pattern 4 or 5, tumour volume <0.5 cm³), according to the Epstein criteria (60.1 versus 29.3, $p < 0.001$; median values: 42.5 vs 21.5).

3.2. Correlation between each active surveillance criterion and pathologic findings in radical prostatectomy specimens

As expected, the rates of pT3 disease, OUD (defined by a pT3 disease and/or a primary Gleason pattern 4), significant PCa, and tumour volume ≥ 0.5 cm³ were greater in men who did not fulfil the selection criteria, whatever AS criteria were used (Table 4). Differences in terms of OUD, significant PCa, and tumour volume reached significance when the biopsy criteria were used. Differences in terms of tumour volume ($p = 0.019$) also reached significance when a PCA3 score cut-off of 25 was used. Differences in terms of PCa

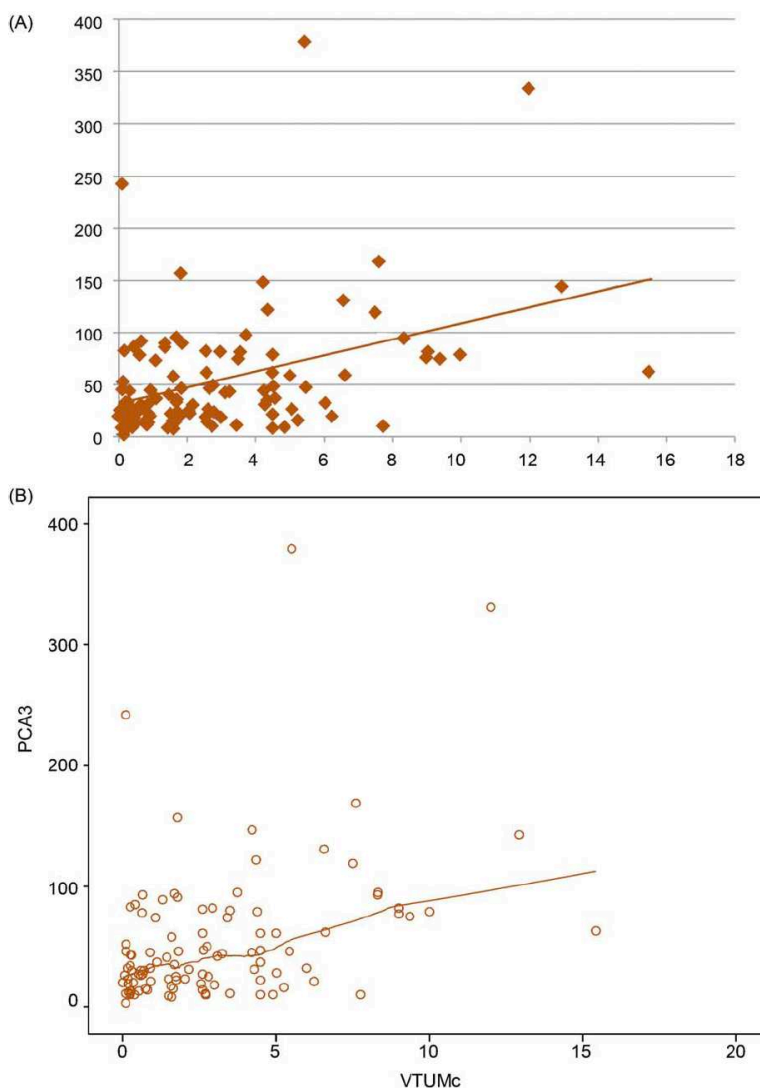


Fig. 1 – (A) Scatter plot illustrating the linear correlation between the prostate cancer antigen 3 (PCA3) score and the tumour volume in radical prostatectomy specimens (y: PCA3 score; x: tumor volume). PCA3 score was strongly correlated with tumour volume in a linear regression analysis ($p < 0.001$, $r = 0.409$). (B) Loess curve testing the linear relationship between the two variables. VTUMc = tumour volume.

Table 3 – Univariate and multivariate linear regression addressing the relationship between tumour volume, prostate volume, prostate-specific antigen, and prostate cancer antigen 3 levels

Univariate	PCA3		Prostate volume		Tumour volume	
	r	p	r	p	r	p
PSA	0.186	0.060	0.298	0.004	0.261	0.007
PCA3	–	–	0.144	0.169	0.409	<0.001
Prostate volume	–	–	–	–	0.013	0.902
Multivariate						
PSA	–	–	–	–	0.269	0.005
PCA3	–	–	–	–	0.362	<0.001
Prostate volume	–	–	–	–	–0.166	0.901

PCA3 = prostate cancer antigen 3; PSA = prostate-specific antigen.

Table 4 – Correlation between each active surveillance criterion (biopsy criteria, PCA3 score, magnetic resonance imaging findings, prostate-specific antigen density) and the prognostic pathologic factors in radical prostatectomy specimens*

	pT3		OUD*		Tumour volume <0.5 cm ³		Insignificant PCa**	
	%	p	%	p	%	p	%	p
Group 1								
Yes	19.5	0.068	22.0	0.021	26.8	0.018	23.2	0.040
No	37.5		45.8	(OR: 0.33)	4.2	(OR: 8.33)	4.2	(OR: 6.97)
Group 2								
Yes	17.9	0.142	21.4	0.147	33.9	0.001	32.1	<0.001
No	30.0		34.0		8.0	(OR: 5.88)	4.0	(OR: 11.4)
Group 3								
Yes	14.9	0.060	17.0	0.033	36.1	0.001	36.1	<0.001
No	30.5		35.6	(OR: 0.37)	10.1	(OR: 5.01)	5.1	(OR: 10.6)
PCA3 <25								
Yes	20.0	0.585	26.6	0.920	36.6	0.019	33.3	0.017
No	25.0		27.6		15.8	(OR: 3.19)	13.2	(OR: 3.30)
PCA3 <35								
Yes	18.2	0.174	21.8	0.184	29.1	0.055	27.3	0.022
No	29.4		33.3		13.7		9.8	(OR: 3.45)
PCA3 <50								
Yes	21.4	0.466	25.7	0.596	27.1	0.058	24.3	0.047
No	27.8		30.5		11.1		8.3	(OR: 3.53)
PCA3 <80								
Yes	21.4	0.307	25.0	0.287	23.8	0.303	21.4	0.235
No	31.8		36.4		13.6		9.1	
Density <0.15								
Yes	21.3	0.398	24.6	0.476	23.0	0.437	21.3	0.366
No	28.6		31.0		16.7		14.3	
T1–2 on MRI								
Yes	21.5	0.014	23.1	0.031	24.6	0.550	23.1	0.247
No	58.3	(OR: 0.20)	58.3	(OR: 0.21)	16.6		8.3	

OR = odds ratio; OUD = overall unfavourable disease; PCa = prostate cancer; PCA3 = prostate cancer antigen 3.

*For each active surveillance (AS) criterion, the percent of men having a pT3 disease, an OUD, or a tumour volume <0.5 cm³ was reported if they fulfilled ("yes") the AS criterion used or not ("no"). Statistical analyses of the differences were noted.

* OUD: pT3 and/or primary Gleason pattern 4.

** Insignificant prostate cancer: organ confined, no Gleason pattern 4 or 5, and tumour volume <0.5 cm³.

Group 1: <33% of positive cores.

Group 2: Fewer than three positive cores.

Group 3: Fewer than three positive cores and <3 mm of tumour length per core.

Table 5 – Multivariate analysis (logistic regression) taking into account each active surveillance criterion for the prediction of unfavourable, non-organ-confined, or low-volume disease in radical prostatectomy specimens

	pT3		OUD*		Tumour volume >0.5 cm ³		Significant PCa	
	OR	p	OR	p	OR	p	OR	p
PCA3	2.28 ⁽¹⁾	0.155	1.83 ⁽¹⁾	0.285	5.37 ⁽⁴⁾	0.010	12.74 ⁽⁴⁾	0.003
Biopsy criteria	2.56 ⁽²⁾	0.125	3.92 ⁽³⁾	0.030	4.14 ⁽⁵⁾	0.050	18.81 ⁽³⁾	0.015
PSA density >0.15	1.22	0.721	1.33	0.613	2.61	0.148	4.75	0.077
MRI findings (T3)	5.28	0.020	5.00	0.025	1.92	0.496	7.73	0.139

OUD = overall unfavourable disease; PCa = prostate cancer; PCA3 = prostate cancer antigen 3.

* OUD: pT3 and/or primary Gleason pattern 4.

⁽¹⁾ PCA3 cut-off: 35.

⁽²⁾ Biopsy criteria: Fewer than three positive cores and <3 mm tumour length per core.

⁽³⁾ Biopsy criteria: <33% positive cores.

⁽⁴⁾ PCA3 cut-off: 25.

⁽⁵⁾ Biopsy criteria: Fewer than three positive cores.

significance reached significance when PCA3 score cut-offs of 25, 35, or 50 were used ($p = 0.017$, $p = 0.022$, and $p = 0.047$, respectively). MRI findings were significantly predictive for pT3 disease ($p = 0.014$) and OUD ($p = 0.031$).

In a multivariate analysis taking into account each AS criterion (biopsy criteria, PCA3 score, MRI findings, PSA density; see Table 5), a high PCA3 score (>25) was an important predictive factor for significant PCa (OR: 12.7; $p = 0.003$) and for tumour volume $\geq 0.5 \text{ cm}^3$ (OR 5.4; $p = 0.010$). Biopsy criteria and MRI findings were signifi-

cantly associated with OUD (OR: 3.9 and 5.0, respectively; $p = 0.030$ and $p = 0.025$, respectively). Only a suspected T3 disease on MRI was significantly predictive for a pT3 disease in RP specimen (OR: 5.3; $p = 0.020$).

3.3. Predictive value of the prostate cancer antigen 3 score relative to the active surveillance biopsy criteria

The association of the PCA3 score and the pathologic findings in RP specimens was then studied in three AS

Table 6 – Correlation between the PCA3 score (four cut-offs tested) and the prognostic pathologic factors in function of the biopsy criteria used for the active surveillance patient selection

	pT3		OUD*		Tumour volume $<0.5 \text{ cm}^3$		Insignificant PCa**	
	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>	%	<i>p</i>
Group 1								
PCA3 <25								
Yes (<i>n</i> = 25)	12.0	0.256	16.0	0.389	44.0	0.020	40.0	0.017
No	22.8		24.6		19.3	(OR: 3.29)	15.8	(OR: 3.56)
PCA3 <35								
Yes (<i>n</i> = 46)	15.2	0.267	17.4	0.259	32.6	0.182	30.4	0.078
No	25.0		27.8		19.4		13.9	
PCA3 <50								
Yes (<i>n</i> = 57)	19.3	0.941	21.1	0.767	31.6	0.143	28.1	0.112
No	20.0		24.0		16.0		12.0	
PCA3 <80								
Yes (<i>n</i> = 68)	19.1	0.843	20.6	0.511	27.9	0.616	25.0	0.387
No	21.4		28.6		21.4		14.3	
AUC PCA3	0.557	–	0.590	–	0.639	–	0.680	–
Group 2								
PCA3 <25								
Yes (<i>n</i> = 22)	13.6	0.507	18.2	0.634	50.0	0.041	45.5	0.086
No	20.6		23.5		23.5	(OR: 3.25)	23.5	
PCA3 <35								
Yes (<i>n</i> = 37)	16.2	0.655	18.9	0.523	37.8	0.389	35.1	0.503
No	21.0		26.3		26.3		26.3	
PCA3 <50								
Yes (<i>n</i> = 43)	18.6	0.791	20.9	0.869	37.2	0.346	34.9	0.424
No	15.3		23.1		23.1		23.1	
PCA3 <80								
Yes (<i>n</i> = 49)	18.4	0.792	20.4	0.635	34.7	0.749	32.7	0.829
No	14.2		28.6		28.6		28.6	
AUC PCA3	0.528	–	0.582	–	0.614	–	0.621	–
Group 3								
PCA3 <25								
Yes (<i>n</i> = 19)	10.5	0.488	10.5	0.329	52.6	0.053	52.6	0.053
No	17.9		21.4		25.0	(OR: 3.33)	25.0	(OR: 3.33)
PCA3 <35								
Yes (<i>n</i> = 31)	12.9	0.594	12.9	0.296	41.9	0.252	41.9	0.252
No	18.8		25.0		25.0		25.0	
PCA3 <50								
Yes (<i>n</i> = 37)	16.2	0.624	16.2	0.778	40.5	0.230	40.5	0.230
No	20.0		20.0		20.0		20.0	
PCA3 <80								
Yes (<i>n</i> = 42)	14.3	0.734	14.3	0.148	38.1	0.426	38.1	0.426
No	20.0		40.0		20.0		20.0	
AUC PCA3	0.559	–	0.627	–	0.689	–	0.672	–

AUC = area under the curve; OUD = overall unfavourable disease; PCa = prostate cancer; PCA3 = prostate cancer antigen 3.

* OUD: pT3 and/or primary Gleason pattern 4.

** Insignificant prostate cancer: organ confined, no Gleason pattern 4 or 5, and tumour volume $<0.5 \text{ cm}^3$.

patient cohorts that were determined based on function of the biopsy criteria (Table 6): group 1, <33% of positive cores; group 2, fewer than three positive cores; and group 3, fewer than three positive cores and <3 mm of cancer involvement per core. The PCA3 score was significantly predictive for insignificant PCa in groups 1 and 3 and for tumour volume <0.5 cm³ in each cohort. The risk of having cancer ≥ 0.5 cm³ was increased by about three-fold in men with PCA3 score ≥ 25 compared with men with PCA3 score <25. Differences in terms of pT3 disease and OUD were not significant. The AUC of the PCA3 score for the prediction of small tumour volume and insignificant PCa ranged from 0.614 to 0.689, according to the biopsy criteria selected. The linear correlation between PCA3 score and tumour volume was maintained regardless of the AS biopsy criteria used ($p < 0.001$; $r = 0.458$, $r = 0.542$, and $r = 0.577$ in groups 1, 2, and 3, respectively).

Results were comparable in a cohort of patients eligible for AS according to the following criteria: PSA <10, no biopsy Gleason pattern 4, clinical stage T1c–T2a, PSA density <0.20 ng/ml per gram, and fewer than three positive cores. PCA3 score <25 was significantly correlated with tumour volume <0.5 cm³ ($p = 0.046$; OR: 3.33), whereas differences in terms of pT3 disease and OUD were not significant.

4. Discussion

A consensus about the most accurate diagnostic strategy remains elusive for men with low-risk cancer who are amenable to AS [9,19,21]. Biopsy criteria such as number of positive cores, tumour length, or percentage of cancer involvement at any core are predictive factors of tumour volume in RP specimens or biochemical failure after RP and, to date, are the main criteria used in AS protocols [22]. However, criteria based on only PSA level, DRE findings, biopsy Gleason score, and extent of cancer involvement appear insufficient to perfectly identify cancers with a low risk of progression [4,10]. Therefore, other factors such as PCA3 score or MRI would provide additional significance. The urinary PCA3 score has been demonstrated to be predictive for cancer in prostate biopsy [23–28]. The study from Haese et al also suggested that men with biopsy Gleason score ≥ 7 had significantly higher PCA3 scores than those with Gleason score 6 cancer [23]. Some studies have evaluated the correlation between PCA3 score and RP findings [18–20]. Thus a significant association between PCA3 score and tumour volume has been emphasised. Whitman et al also found an association between PCA3 and extraprostatic extension, whereas Nakanishi et al demonstrated a significant link between PCA3 and high Gleason score. More recently, in a 160-case series, Auprich et al confirmed PCA3 score as a valuable predictor of pathologically confirmed insignificant PCa [29]. They found that the PCA3 scores were significantly lower with insignificant disease and that addition of the PCA3 score in multivariable models increased the accuracy of insignificant PCa prediction. Hessels et al did

not confirm these correlations in their recent study [16], but the number of RP specimens included in their study was small. Their patient cohort was also different, including few men with favourable features: 40% of pT3 disease, and only 10 cancers had a volume <0.5 cm³. Thus the authors emphasised that a larger study could better differentiate a predictive value of PCA3 score for adverse features, especially in a cohort with low-risk categories. Despite the possible prognostic value of PCA3 score, only one study focused on this impact for expectant management [13]. In this study, the PCA3 score failed to predict biologic or clinical progression in men enrolled in an AS programme. However, the usefulness of PCA3 score as an initial selection criterion has not been correlated with pathologic findings in RP specimens.

Our present findings supported the hypothesis that the PCA3 score may be a useful marker to improve the selection for AS. There was a trend towards higher PCA3 scores in patients with unfavourable, significant, and large-volume PCa. Nevertheless, we were unable to identify a threshold value for PCA3 that could accurately classify high-risk men with non-organ-confined disease. Thus our results support evidence that the PCA3 score cannot be integrated in AS selection as a single prognostic variable.

The PCA3 score was strongly indicative for tumour volume and for significance of PCa according to the current Epstein definition [18]. We identified the value of 25 as predictive for a tumour volume <0.5 cm³ that bore witness of insignificant disease. The risk of having a cancer ≥ 0.5 cm³ and significant PCa was increased by three-fold in men with a PCA3 score of ≥ 25 compared with men with a PCA3 score of <25 with most AS biopsy criteria used. The PCA3 score was significantly predictive for insignificant PCa in groups 1 and 3 and for tumour volume <0.5 cm³ in each cohort.

Our study has several limitations. We examined a relatively small cohort of AS patients, and we cannot exclude the possibility that a larger study would have allowed detection of group differences in terms of prediction of non-organ-confined disease. In our analysis, other predictive tools such as biopsy criteria and MRI findings appeared to be more relevant in predicting non-organ-confined disease, as previously described [30]. It is also noteworthy that PCA3 score could be an interesting tool to reclassify as low risk those patients who were excluded from AS by the current biopsy criteria.

5. Conclusions

Our present findings support the hypothesis that PCA3 score may be a useful marker to improve the selection for AS in addition to the current AS criteria. There is a trend towards higher PCA3 scores in patients with unfavourable and large-volume PCa. Nevertheless, we were unable to identify a threshold value for PCA3 that could accurately classify high-risk men with non-organ-confined disease when the PCA3 score was used as a single AS criterion. However, with a predictive cut-off of 25, PCA3 score is strongly indicative for tumour volume.

Author contributions: Guillaume Ploussard had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study concept and design: Ploussard, Durand, de la Taille.

Acquisition of data: Ploussard, Durand, Xylinas, Moutereau, Radulescu, Forgue, Salomon, de la Taille.

Analysis and interpretation of data: Ploussard, Durand, Xylinas, Radulescu, Terry, Allory, Loric, Salomon, Vacherot, de la Taille.

Drafting of the manuscript: Ploussard, Durand.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Vacherot, de la Taille.

Statistical analysis: Nicolaiew, Ploussard.

Obtaining funding: None.

Administrative, technical, or material support: None.

Supervision: None.

Other (specify): None.

Financial disclosures: I certify that all conflicts of interest, including specific financial interests and relationships and affiliations relevant to the subject matter or materials discussed in the manuscript (eg, employment/affiliation, grants or funding, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, royalties, or patents filed, received, or pending), are the following: None.

Funding/Support and role of the sponsor: None.

References

- [1] Bastian PJ, Carter BH, Bjartell A, et al. Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. *Eur Urol* 2009;55:1321–32.
- [2] van den Bergh RCN, Roemeling S, Roobol MJ, et al. Outcomes of men with screen-detected prostate cancer eligible for active surveillance who were managed expectantly. *Eur Urol* 2009;55:1–8.
- [3] Kattan MW, Eastham JA, Wheeler TM, et al. Counseling men with prostate cancer: a nomogram for predicting the presence of small, moderately differentiated, confined tumors. *J Urol* 2003;170:1792–7.
- [4] Suardi N, Capitanio U, Chun FK, et al. Currently used criteria for active surveillance in men with low-risk prostate cancer: an analysis of pathologic features. *Cancer* 2008;113:2068–72.
- [5] Conti SL, Dall'era M, Fradet V, Cowan JE, Simko J, Carroll PR. Pathological outcomes of candidates for active surveillance of prostate cancer. *J Urol* 2009;181:1628–33.
- [6] Choo R, Klotz L, Danjoux C, et al. Feasibility study: watchful waiting for localized low to intermediate grade prostate carcinoma with selective delayed intervention based on prostate specific antigen, histological and/or clinical progression. *J Urol* 2002;167:1664–9.
- [7] Patel MI, DeConcini DT, Lopez-Corona E, Ohori M, Wheeler T, Scardino PT. An analysis of men with clinically localized prostate cancer who deferred definitive therapy. *J Urol* 2004;171:1520–4.
- [8] Mohler JL, Williams BT, Freeman JA. Expectant management as an option for men with stage T1c prostate cancer: a preliminary study. *World J Urol* 1997;15:364–8.
- [9] Mottet N, Irani J. Active surveillance in prostate cancer: the French protocol. *Prog Urol* 2008;18:F12–6.
- [10] Ploussard G, Salomon L, Xylinas E, et al. Pathological findings and prostate specific antigen outcomes after radical prostatectomy in men eligible for active surveillance—does the risk of misclassification vary according to biopsy criteria? *J Urol* 2010;183:539–44.
- [11] Abouassaly R, Lane BR, Jones JS. Staging saturation biopsy in patients with prostate cancer on active surveillance protocol. *Urology* 2008;71:573–7.
- [12] Berglund RK, Masterson TA, Vora KC, Eggener SE, Eastham JA, Guillonneau BD. Pathological upgrading and up staging with immediate repeat biopsy in patients eligible for active surveillance. *J Urol* 2008;180:1964–7.
- [13] Tosoian JJ, Loeb S, Kettermann A, et al. Accuracy of PCA3 measurement in predicting short-term biopsy progression in an active surveillance program. *J Urol* 2010;183:534–8.
- [14] Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol* 2008;179:1804–9.
- [15] Whitman EJ, Groskopf J, Ali A, et al. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *J Urol* 2008;180:1975–8.
- [16] Hessels D, van Gils MP, van Hooij O, et al. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate* 2010;70:10–6.
- [17] Chen ME, Johnston D, Reyes AO, Soto CP, Babaian RJ, Troncoso P. A streamlined three-dimensional volume estimation method accurately classifies prostate tumors by volume. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1291–301.
- [18] Epstein JI, Chan DW, Sokoll LJ, et al. Nonpalpable stage T1c prostate cancer: prediction of insignificant disease using free/total prostate specific antigen levels and needle biopsy findings. *J Urol* 1998;160:2407–11.
- [19] van As NJ, Norman AR, Thomas K, et al. Predicting the probability of deferred radical treatment for localised prostate cancer managed by active surveillance. *Eur Urol* 2008;54:1297–305.
- [20] Shukla-Dave A, Hricak H, Kattan MW, et al. The utility of magnetic resonance imaging and spectroscopy for predicting insignificant prostate cancer: an initial analysis. *BJU Int* 2007;99:786–93.
- [21] Dall'era MA, Konety BR, Cowan JE, et al. Active surveillance for the management of prostate cancer in a contemporary cohort. *Cancer* 2008;112:2664–70.
- [22] Greene KL, Elkin EP, Karapetian A, Duchane J, Carroll PR, Kane CJ. CaPSURE Investigators. Prostate biopsy tumor extent but not location predicts recurrence after radical prostatectomy: results from CaPSURE. *J Urol* 2006;175:125–9.
- [23] Haese A, de la Taille A, van Poppel H, et al. Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. *Eur Urol* 2008;54:1081–8.
- [24] Deras IL, Aubin SM, Blase A, et al. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *J Urol* 2008;179:1587–92.
- [25] Chun FK, de la Taille A, van Poppel H, et al. Prostate cancer gene 3 (PCA3): development and internal validation of a novel biopsy nomogram. *Eur Urol* 2009;56:659–68.
- [26] Roobol MJ, Schröder FH, van Leeuwen P, et al. Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test. *Eur Urol* 2010;58:475–81.
- [27] Auprich M, Haese A, Walz J, et al. External validation of urinary PCA3-based nomograms to individually predict prostate biopsy outcome. *Eur Urol* 2010;58:727–32.
- [28] Perdonà S, Cavadas V, Di Lorenzo G, et al. Prostate cancer detection in the “grey area” of prostate-specific antigen below 10 ng/ml: head-to-head comparison of the updated PCPT calculator and Chun's nomogram, two risk estimators incorporating prostate cancer antigen 3. *Eur Urol* 2011;59:81–7.
- [29] Auprich M, Chun FK-H, Ward JF, et al. Critical assessment of preoperative urinary prostate cancer antigen 3 on the accuracy of prostate cancer staging. *Eur Urol* 2011;59:96–105.
- [30] van As NJ, de Souza NM, Riches SF, et al. A study of diffusion-weighted magnetic resonance imaging in men with untreated localised prostate cancer on active surveillance. *Eur Urol* 2009;56:981–8.

Discussion et Perspectives

1- Impact pronostique de la β III-tubuline dans le cancer de prostate au stade localisé

Les résultats des expériences conduites au cours de ce travail de thèse soulignent l'importance de l'expression de la β III-tubuline dans l'histoire naturelle du cancer de prostate. En s'appuyant sur des données de laboratoire *in vitro* et *in vivo*, nous présentons pour la première fois à notre connaissance, des données cliniques concernant l'impact pronostique de la β III-tubuline, sur des cohortes de patients à différents stades de la maladie tumorale.

Nos premiers résultats ont montré la faible fréquence d'expression de la protéine β III-tubuline dans les cancers de prostate localisés, candidats à un traitement par prostatectomie totale (PT). L'expression de la β III-tubuline n'a pas été retrouvée dans le tissu prostatique non-néoplasique adjacent au tissu cancéreux. Ces résultats vont dans le sens de travaux précédemment publiés (Ranganathan et al., 1997 ; Egevad et al., 2010). L'expression de la β III-tubuline était retrouvée dans seulement 16% des cancers de notre cohorte. De façon intéressante, cette expression était significativement corrélée aux cancers agressifs et de mauvais pronostic. Son expression était également significativement associée à la récurrence biologique après chirurgie. Le point important est que cet impact pronostique était conservé dans une analyse multivariée intégrant les paramètres histopronostiques reconnus.

Cette valeur pronostique est donc indépendante des facteurs histopronostiques établis. L'expression de la β III-tubuline dans le tissu cancéreux pourrait donc amener à proposer une thérapie adjuvante aux patients β III-tubuline positifs et participer à la réflexion clinique. Dans ce sens, un essai clinique randomisé prospectif a été conduit au sein du Service d'Urologie de l'hôpital Mondor, évaluant l'efficacité sur la récurrence d'une chimiothérapie adjuvante dans les CaP à haut risque. Les résultats oncologiques sont attendus dans les années qui viennent. Les échantillons tissulaires de chaque patient seront analysés afin d'établir une signature génique des ces CaP à haut risque de récurrence. Le gène de la β III-tubuline pourrait donc ressortir comme candidat à cette signature. Des études immunohistochimiques sur de plus larges cohortes seront nécessaires pour déterminer si la β III-tubuline permet d'isoler un sous-type particulier de CaP.

Les limites de nos résultats résident essentiellement dans l'étude d'une cohorte unique interne et dans l'étude de tissus échantillonnés sur TMA. Les carottes des TMA ont été prélevées en tissu représentatif du contingent le plus agressif du cancer, c'est-à-dire dans des zones importantes de cancer de score de Gleason élevé. L'échantillonnage du cancer par 4 carottes constitue une limite dans l'interprétation de nos résultats. La deuxième limite est le faible

pourcentage de positivité en β III-tubuline dans les CaP localisés, ce qui limite son utilisation comme marqueur pronostique à ce stade peu évolué de la maladie.

2- Augmentation de l'expression de la β III-tubuline dans les cancers de prostate hormono-résistants

L'analyse de l'expression de la β III-tubuline ont fait apparaître une relation forte et significative entre cancer hormono-résistant et expression de la β III-tubuline: 77% des cancers au stade de l'hormono-échappement (HRPC) exprimaient la β III-tubuline, contre 16% des cancers hormono-naïfs (HNPC). L'expression de la β III-tubuline était plus importante en nombre de cas, mais également dans l'intensité et le pourcentage de marquage dans le tissu. Néanmoins, le principal biais d'une étude de comparaison purement immunohistochimique entre HRPC et HNPC résidait dans le fait que la β III-tubuline était associée dans la cohorte HNPC aux cancers avec pathologie défavorable (score de Gleason élevé, extension extraprostatique). La différence de marquage pour l'anticorps anti- β III-tubuline entre HNPC et HRPC pouvait donc être due au simple fait que les cancers de la cohorte HRPC étaient plus agressifs que les cancers HNPC au diagnostic.

Les données de la littérature confortent l'idée de relation entre suppression des androgènes et β III-tubuline. En effet, le phénomène de neuro-transdifférenciation (ou différenciation neuro-endocrine) est un mécanisme connu de l'échappement hormonal (Mori et al., 2009 ; Yuan et al., 2007). Ainsi, les cellules cultivées en milieu appauvri en androgènes acquièrent des caractéristiques neuro-endocrines pour pouvoir survivre (Burchardt et al., 1999). La β III-tubuline est exprimée de façon préférentielle dans le tissu nerveux et dans les cellules neuro-endocrines, et apparaît donc comme un marqueur potentiel de ce processus de neuro-transdifférenciation (Katsetos et al., 2000 and 2003). Wright et al ont aussi montré que l'expression de la β III-tubuline était induite dans des cellules LNCaP après 4 jours de culture en milieu strippé (sans androgènes) ou après une extinction de l'expression du récepteur des androgènes par siRNA (Landers et al., 2005). Nos résultats sur la lignée LNCaP, *in vitro* maintenue dans un milieu appauvri en androgènes, et *in vivo* sur un modèle de xéno greffe, confirment les données de la littérature. De plus, nous avons observé que les cellules LNCaP transfectés avec un vecteur d'expression contenant l'ORF de la β III-tubuline, présentaient une morphologie de cellules neuro-endocrines. Ces données soulignent donc le rôle important de la β III-tubuline dans le processus de neuro-transdifférenciation.

Nos données nous permettent donc conclure sur l'association entre expression de la β III-tubuline et suppression des androgènes. Ils nous manquent cependant des données fonctionnelles pour déterminer le rôle exact de la β III-tubuline dans le phénomène d'échappement hormonal. L'augmentation de la β III-tubuline joue-t-elle un rôle important dans l'agressivité de la maladie dans la phase de traitement hormonal ou est-elle un mécanisme secondaire, une conséquence de l'hormono-résistance ?

Récemment une étude a montré le rôle du récepteur aux oestrogènes dans la régulation de la β III-tubuline dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Saussede-Aim et al., 2009). Cette observation peut s'avérer importante dans le CaP, la signalisation dépendante des oestrogènes ayant été associée à l'agressivité du CaP (Setlur et al., 2008 ; Bonkhoff et al, 2001). L'hypoxie a également été suggérée comme facteur stimulant l'expression de la β III-tubuline (Raspaglio et al., 2008). Or, la réponse à l'hypoxie peut être altérée dans des tumeurs et cellules hormono-résistantes (Anastasidis et al., 2002). D'autres approches sont donc nécessaires pour cerner le rôle exact de la β III-tubuline dans la réponse au traitement hormonal.

3- Rôle de la β III-tubuline dans la résistance au docétaxel

La littérature sur le rôle de la β III-tubuline dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques ciblant les microtubules (taxanes, vinca-alcaloïdes) est abondante.

Peu d'études existaient dans le cancer de prostate, toutes conduites par la même équipe sur une seule lignée cellulaire, DU 145. Des données encourageantes retrouvaient une augmentation des niveaux de β III-tubuline, à la fois au niveau du transcrit et de la protéine, lorsque les cellules étaient cultivées dans un milieu contenant du paclitaxel (Ranganathan et al., 1998). Dans des modèles cellulaires d'hormono-résistance, nous avons retrouvé des résultats similaires, à savoir une augmentation de l'expression de la β III-tubuline lorsque les cellules étaient traitées par du docétaxel. L'expression était d'autant plus marquée au cours du temps (24, 48, 72h) et avec des concentrations élevées de docétaxel. L'expression de la β III-tubuline apparaissait donc comme une réponse cellulaire au traitement par docétaxel. Les données fonctionnelles *in vitro* obtenues grâce à la sur-expression par transfection du gène de la β III-tubuline et à l'extinction de l'expression par approche siARN dans les lignées cellulaires soulignaient que le niveau d'expression de la β III-tubuline modulait la sensibilité des cellules au docétaxel, et confortaient la notion de sur-expression de β III-tubuline en tant

que mécanisme de résistance aux taxanes. Cette diminution de la sensibilité par transfection était d'autant plus marquée dans les lignées LNCaP androgéno-sensibles, n'exprimant pas la β III-tubuline à l'état parental. Contrairement à nos résultats, Ranganathan et al n'ont pas réussi à mettre en évidence une résistance au paclitaxel induite par la sur-expression de la β III-tubuline, par une transfection du gène dans les lignées DU 145 (Ranganathan et al., 2001). Pour expliquer leurs résultats, les auteurs rapportaient une augmentation concomitante des isotypes β II et β IV, contrebalançant les effets de la sur-expression de la β III-tubuline. Leurs résultats de l'analyse en Western-blot montraient cependant une différence d'expression faible de la β III-tubuline entre lignée parentale et lignée transfectée. En effet, les DU 145 sont des cellules androgéno-indépendantes exprimant à l'état parental la β III-tubuline. Nous avons également choisi de traiter les cellules par docétaxel (et non paclitaxel) qui est actuellement le taxane validé dans le CaP hormono-résistant (Tannock et al., 2004 ; Petrylak et al., 2004).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu réunir les données cliniques et les biopsies de 37 patients traités par docétaxel au stade de l'hormono-échappement. Comme attendu du fait de la corrélation entre β III-tubuline et cancer agressif, l'expression de la β III-tubuline a été retrouvée dans 46% des cas analysés, la plupart des patients ayant un CaP agressif au diagnostic (score de Gleason médian à 8). Les résultats allaient dans le sens des données *in labo* et montraient que l'expression de la β III-tubuline sur le tissu biopsique initial était associée à des taux de réponse plus faible. Ces résultats peuvent avoir une implication clinique majeure s'ils sont confirmés dans une plus large cohorte et avec des patients provenant d'autres centres de référence. En effet, aucun facteur prédictif de réponse au docétaxel n'est actuellement validé dans le cancer de prostate. Le principal écueil de notre analyse, en dehors de son caractère rétrospectif, est de considérer le tissu initial hormono-naïf. Nous avons démontré au cours du travail de recherche que la suppression des androgènes par le traitement hormonal provoquait une augmentation de l'expression de la β III-tubuline. Cependant, la collection de tissus hormono-résistants est difficile car peu de patients sont opérés au stade d'échappement hormonal (résection de prostate à visée symptomatique), et limite l'étude de facteurs prédictifs tissulaires. L'étude du tissu initial présente donc un intérêt majeur, celui de disposer d'échantillons tissulaires pour tous les patients traités par docétaxel.

L'ensemble de ces résultats soulignait l'importance de la sur-expression de la β III-tubuline dans les mécanismes de résistance des cellules tumorales aux taxanes. Nos résultats offrent une base rationnelle, permettant de mieux sélectionner les patients candidats à une autre

chimiothérapie que la chimiothérapie par taxanes, grâce à l'analyse de l'expression de la β III-tubuline sur le tissu cancéreux. Des nouvelles expériences sont prévues, afin d'évaluer l'impact de la sur-expression de la β III-tubuline sur la sensibilité des cellules au cabazitaxel, taxane de dernière génération ayant prouvé son efficacité en deuxième thérapeutique après docétaxel.

Sur le plan clinique, de nouveaux agents thérapeutiques actifs dans le CaP résistant à la castration ont été développés (cabazitaxel, abiratérone, MDV-3100). Un séco-taxane, l'IDN5390, a également démontré un effet anti-tumoral synergique en association au paclitaxel, dans le traitement de cellules sur-exprimant la β III-tubuline, suggérant que cette association thérapeutique court-circuitait la résistance due à la sur-expression de la β III-tubuline (Ferlini et al., 2005). Les épothilones, qui partagent les mécanismes d'action des taxanes, ont montré une activité anti-tumorale prometteuse chez les patientes atteintes de cancer du sein résistant au paclitaxel (Cortes et al., 2007). De façon intéressante, l'activité de ces molécules ne semble pas être affectée par la composition isotypique des dimères d' $\alpha\beta$ -tubuline (Magnani et al., 2006). Dans le CaP, des études pilotes de phase I et II ont récemment été publiées et ont montré la faisabilité d'un traitement par épothilones dans le cancer de prostate hormono-résistant (Rosenberg et al., 2009 ; Hussain et al., 2009 ; Rivera et al., 2008 ; Galsky et al., 2005). Cependant, l'efficacité clinique anti-tumorale reste encore à déterminer.

En cas de confirmation du caractère prédictif de la β III-tubuline sur la réponse à la chimiothérapie et sur la survie globale, l'utilisation d'autres agents que le docétaxel pourrait être intéressante dans le cas de cancer exprimant d'emblée la β III-tubuline. Les données conjointes de chimiorésistance induite par la β III-tubuline et d'augmentation de son expression par la suppression des androgènes font évoquer l'idée d'une chimiothérapie plus précoce, avant le stade d'hormono-résistance, ou en situation pré-docatéxel.

Une collaboration entre les Hôpitaux Henri Mondor et Saint-Louis est actuellement en cours. Devant la difficulté éthique de récupérer des tissus résistants à la castration avant la mise en route du docétaxel, des échantillons d'urines sont prélevés chez tous les patients candidats au docétaxel en première ligne de traitement. L'analyse de l'expression urinaire de la β III-tubuline sera effectuée avec comme critères de jugement, la réponse au docétaxel et la survie globale.

4- Impact clinique du score PCA3

La surveillance active est depuis quelques années un traitement validé du CaP à faible risque (Heidenreich et al., 2011). Cependant, les critères initiaux au diagnostic de faible risque évolutif ne sont pas clairement identifiés, et varient de façon importante en fonction des centres. Cette variabilité souligne l'imperfection de la combinaison de ces critères actuellement disponibles pour identifier de manière formelle un CaP non significatif, qui n'aura a priori pas de progression clinique ou biologique au cours de la vie du patient, et donc conceptuellement, dont le traitement serait inutile (Bastian et al., 2004 ; Ploussard et al., 2011b). De nombreuses études ont ainsi cependant insisté sur la sous-classification pré-opératoire en CaP à faible risque d'environ 20-25% de CaP à risque élevé de progression (Ploussard et al., 2010b, Suardi et al., 2008). Dans notre série, le taux de migration du score de Gleason entre les biopsies et la pièce opératoire (26,8%), le taux de migration du stade clinique au stade pathologique (29,3%), soulignait également ce risque. La nécessité de trouver des marqueurs prédictifs de la significativité de la maladie lors de la décision de traitement est au cœur de la problématique clinique actuelle, afin d'identifier les CaP non significatifs, meilleurs candidats à la surveillance active.

Nos résultats ont confirmé dans une cohorte de patients éligibles à la surveillance active que le score PCA3 (qui intègre dans son calcul le degré de transcription du PSA) était un marqueur indépendant du taux sérique de PSA et du volume de la prostate. Cette qualité soustrait à la réflexion du clinicien la confusion qui pourrait intervenir lors de la présence d'un cancer indolent au sein d'une grosse prostate et qui exprimerait un PSA sérique important.

Alors que les résultats des différentes études concernant le lien entre PCA3, score de Gleason et extension extra-prostatique sont contradictoires, les résultats obtenus dans notre étude concernant le volume tumoral confirment les précédentes données publiées. L'intérêt supplémentaire de ce travail de thèse a été de considérer de façon prospective une large cohorte de patients éligibles à la surveillance active, c'est-à-dire ayant a priori, sur les critères pré-thérapeutiques, un cancer à faible volume tumoral. Le score PCA3 est significativement corrélé au volume tumoral, même dans une cohorte de CaP à faible volume tumoral. Plus le PCA3 est élevé et plus le volume tumoral semble être important. Le score PCA3 apparaît comme un facteur prédictif indépendant en analyse multivariée d'un volume tumoral > 0,5 ml et de la présence d'un CaP non significatifs. Ces résultats corroborent les corrélations rapportées précédemment par Whitman, Nakashini et plus récemment d'Auprich (Whitman et

al., 2008 ; Nakanishi et al., 2008 ; Auprich et al., 2010). Cette corrélation au volume tumoral de PCA3 peut donc avoir une implication immédiate en pratique clinique : l'amélioration de la sélection des patients éligibles à une surveillance active. Si la PCA3 doit être considéré comme une variable continue, la décision clinique impose de se fixer un seuil à partir duquel le PCA3 impacte la pratique. Ce seuil est extrapolé statistiquement à partir des analyses de régression logistique et des courbes ROC en particulier, qui déterminent une valeur pour laquelle spécificité et sensibilité sont optimales. Ainsi, pour la détection du cancer de prostate (la prédiction de positivité des biopsies), le seuil de 35 a été retenu (Marks et al., 2007 ; Haese et al., 2008). Concernant la performance de prédiction de l'effraction capsulaire, Whitman retient un seuil de 47. Nakashini rapporte un seuil de 25 pour celle du volume tumoral > 0,5 ml. Notre analyse confirme que le seuil optimal de PCA3 pour la prédiction du volume tumoral > 0,5 et de la présence de cancer significatif se situe à 25.

Le score urinaire PCA3 n'apporte en revanche pas de valeur ajoutée aux critères biopsiques habituels, ni à l'IRM dans la prédiction d'une maladie extraprostatique ou à score de Gleason élevé.

L'utilisation comme critère d'inclusion dans des protocoles de surveillance active du critère PCA3 <25 permettrait de mieux identifier les cancers non significatifs. L'étape suivante sera d'intégrer de façon prospective le score PCA3 dès l'inclusion des patients en surveillance active. Cela permettra de valider ou non le PCA3 comme critère important de sélection, avec comme critère de jugement principal le risque de traitement différé au cours de la surveillance. Renouveler ce dosage après un an de surveillance pourrait également s'avérer pertinent afin de juger de corrélation entre progression clinique et biologique et évolution du score PCA3.

<i>Résultats</i>	<i>Perspectives de recherche</i>
L'expression de la β III-tubuline est relativement faible dans le CaP hormono-naïf mais est augmentée par la suppression androgénique.	Expériences fonctionnelles évaluant le rôle de cette sur-expression dans le phénomène de résistance à la castration .
L'expression de la β III-tubuline est associée à l'agressivité tumorale et est un marqueur prédictif indépendant de récurrence biochimique après chirurgie.	-Confirmation sur cohorte externe -CaP exprimant la β III-tubuline : candidat à une thérapie adjuvante , à visée de prévention de la récurrence ?
Rôle de la β III-tubuline en tant que médiateur de la résistance des cellules de CaP au docétaxel	β III-tubuline, cible thérapeutique des nouvelles thérapies du CaP résistant à la castration ?
L'expression de la β III-tubuline dans les cellules tumorales est un facteur prédictif indépendant de survie globale pour les patients recevant une chimiothérapie par docétaxel	-Utilisation comme biomarqueur théranostique avant mise en route d'une chimiothérapie par docétaxel -Etude de l'expression de la β III-tubuline dans le fluide urinaire après massage prostatique de patients résistants à la castration
Un score PCA3 <25 est fortement indicatif d'un faible volume tumoral et de la présence d'un CaP non significatif.	Réalisation de manière prospective d'un test urinaire PCA3 aux patients candidats à la surveillance active : lien entre PCA3 et traitement différé ?

Bibliographie

Aarnisalo P, Santti H, Poukka H, Palvimo JJ, and Janne OA. Transcription activating and repressing functions of the androgen receptor are differentially influenced by mutations in the deoxyribonucleic acid-binding domain. *Endocrinology* 1999;140: 3097-3105.

Abate-Shen C, Banach-Petrosky WA, Sun et al. Nkx3.1; Pten mutant mice develop invasive prostate adenocarcinoma and lymph node metastases. *Cancer Res* 2003;63:3886-3890.

Agoulnik IU, Vaid A, Nakka M, et al. Androgens modulate expression of transcription intermediary factor 2, an androgen receptor coactivator whose expression level correlates with early biochemical recurrence in prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:10594-10602.

Ahmed AA, Mills AD, Ibrahim AE, et al. The extracellular matrix protein TGFBI induces microtubule stabilization and sensitizes ovarian cancers to paclitaxel. *Cancer Cell* 2007;12:514-27

Akasaka K, Maesawa C, Shibasaki M, et al. Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2009;129:1516-26

Alli E, Yang JM, Ford JM, Hait WN. Reversal of stathmin-mediated resistance to paclitaxel and vinblastine in human breast carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2007;71:1233-40

Anastasiadis AG, et al., Human hormone-refractory prostate cancers can harbor mutations in the O(2)-dependent degradation domain of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:358-62

Andriole GL, Bostwick DG, Brawley OW, Gomella LG, Marberger M, Montorsi F, Pettaway CA, Tammela TL, Teloken C, Tindall DJ, Somerville MC, Wilson TH, Fowler IL, Rittmaster RS; REDUCE Study Group. Effect of dutasteride on the risk of prostate cancer. *N Engl J Med* 2010;362:1192-202

Ankerst DP, Groskopf J, Day JR, Blase A, Rittenhouse H, Pollock BH, Tangen C, Parekh D, Leach RJ, Thompson I. Predicting prostate cancer risk through incorporation of prostate cancer gene 3. *J Urol* 2008;180:1303-8

Aoki D, Watanabe Y, Jobo T, et al. Favourable prognosis with modified dosing of docetaxel and cisplatin in Japanese patients with ovarian cancer. *Anticancer Res* 2009;29:561-6

Attard G, Reid AH, Olmos D, de Bono JS. Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven. *Cancer Res* 2009;69:4937-40

Attard G, Richards J, de Bono JS. New strategies in metastatic prostate cancer: targeting the androgen receptor signaling pathway. *Clin Cancer Res* 2011;17:1649-57

Auprich M, Chun FK, Ward JF, et al. Critical assessment of preoperative urinary prostate cancer antigen 3 on the accuracy of prostate cancer staging. *Eur Urol* 2011;59:96-105

Auprich M, Haese A, Walz J, et al. External validation of urinary PCA3-based nomograms to individually predict prostate biopsy outcome. *Eur Urol* 2010;58:727-32

Bandyopadhyay S, Pai SK, Hirota S, et al. PTEN up-regulates the tumor metastasis suppressor gene Drg-1 in prostate and breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:7655-7660.

Banerjee A et al. Increased microtubule assembly in bovine brain tubulin lacking the type III isotype of beta-tubulin. *J Biol Chem* 1990;265:1794-9

Baselga J, Zambetti M, Llombart-Cussac A, et al. Phase II genomics study of ixabepilone as neoadjuvant treatment for breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:526-34

Bastian PJ, Mangold LA, Epstein JI, Partin AW. Characteristics of insignificant clinical T1c prostate tumors. A contemporary analysis. *Cancer* 2004;101:2001-5

Beato M, Candau R, Chavez S, Mows C, and Truss M. Interaction of steroid hormone receptors with transcription factors involves chromatin remodelling. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;56:47-59.

Beato, M., and Klug, J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000;6:225-236.

Becker C, Piironen T, Pettersson K, Hugosson J, Lilja H. Clinical value of human glandular kallikrein 2 and free and total prostate-specific antigen in serum from a population of men with prostate-specific antigen levels 3.0ng/mL or greater *Urology* 2000;55:694-699

Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, et al. Stathmin activity influences sarcoma cell shape, motility, and metastatic potential. *Mol Biol Cell* 2008;19:2003-1

Belot A, Grosclaude P, Bossard N, et al. Cancer incidence and mortality in France over the période 1980-2005. *Rev Epidemiol Sant Pub* 2008 ;56:159-75.

Benchikh El Fegoun A, Villers A. Molecular forms of PSA *Prog Urol* 2007;17: 165-171

Berger R, Lin DI, Nieto M, et al. Androgen-dependent regulation of Her-2/neu in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:5723-5728.

Berges RR, Vukanovic J, Epstein JI, et al. Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1:473-480.

Bernard-Marty C, Treilleux I, Dumontet C, et al. Microtubule-associated parameters as predictive markers of docetaxel activity in advanced breast cancer patients: results of a pilot study. *Clin Breast Cancer* 2002;3:341-5

Berney DM, Gopalan A, Kudahetti S, et al. Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. *Br J Cancer* 2009;100:888-93

Berrieman HK, Lind MJ, Cawkwell L. Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lancet Oncol* 2004;5:158-64

Berthold DR, Pond GR, Soban F, de Wit R, Eisenberger M, Tannock IF. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study. *J Clin Oncol* 2008;26:242-5

Bertram J, Peacock JW, Fazli L, et al. Loss of PTEN is associated with progression to

androgen independence. *Prostate* 2006;66:895-902

Bjartell A, Montironi R, Berney DM, Egevad L. Tumour markers in prostate cancer II: diagnostic and prognostic cellular biomarkers. *Acta Oncol* 2011;50:76-84

Bolla M, Van Tienhoven G, Warde P, et al. External irradiation with or without long-term androgen suppression for prostate cancer with high metastatic risk: 10-year results of an EORTC randomised study. *Lancet Oncol* 2010;11:1066-73

Bonkhoff, H., et al., Progesterone receptor expression in human prostate cancer: correlation with tumor progression. *Prostate* 2001;48:285-91

Bostwick DG, Pacelli A, Blute M, Roche P, Murphy GP. Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer* 1998;82:2256-61

Botchkina GI, Kim RH, Botchkina IL, Kirshenbaum A, Frischer Z, Adler HL. Non invasive detection of prostate cancer by quantitative analysis of telomerase activity *Clin Cancer Res* 2005;11:3243-3249

Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, et al. Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res* 2000;60:6111-6115.

Brase JC, Johannes M, Schlomm T, et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer* 2011;128:608-16

Brooks JD, Bova GS, Ewing CM, et al. An uncertain role for p53 gene alterations in human prostate cancers. *Cancer Res* 1996;56:3814-3822.

Burchardt M, Burchardt T, Shabsigh A, et al. Reduction of wild type p53 function confers a hormone resistant phenotype on LNCaP prostate cancer cells. *Prostate* 2001;48:225-230.

Burchardt T, et al. Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. *J Urol* 1999;162:1800-5

Bussemakers MJG, Van Bokhoven A, Verhaegh GW et al. DD3: A new prostate- specific gene, highly over-expressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59:5975–5979

Byar DP, and Corle DK. Hormone therapy for prostate cancer: results of the Veterans Administration Cooperative Urological Research Group studies. NCI Monogr 1988;165-170.

Cairns P, Esteller M, Herman JG, et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation Clin Cancer Res 2001;7:2727-2730

Cancel-Tassin G, Latil A, Valeri A, et al. PCAP is the major known prostate cancer predisposing locus in families from south and west Europe. Eur J Hum Genet 2001;9:135-142.

Carter BS, Bova GS, Beaty TH, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. J Urol 1993;150:797-802.

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. JAMA 1992;267:2215-2220.

Carvalho GF, Humphrey PA, Thorson P, Yan Y, Ramos CG, Catalona WJ. Visual estimate of the percentage of carcinoma is an independent predictor of prostate carcinoma recurrence after radical prostatectomy. Cancer 2000;89:1308-14

Catalona WJ, Bartsch G, Rittenhouse HG, et al. Serum pro prostate specific antigen improves cancer detection compared to free and complexed prostate specific antigen in men with prostate specific antigen 2 to 4ng/ml J Urol 2003; 170:2181-2185

Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. JAMA 1998;279:1542-1547.

Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, et al. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. Eur Urol 2011;59:671-81

Cerveira N, Ribeiro FR, Peixoto A, et al. TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. Neoplasia 2006;8:826-832.

Cetnar JP, Malkowicz SB, Palmer SC, Wein AJ, Vaughn DJ. Pilot trial of adjuvant paclitaxel plus estramustine in resected high-risk prostate cancer. Urology 2008;71:942-946

Chang CY, Walther PJ, and McDonnell DP. Glucocorticoids manifest androgenic activity in a cell line derived from a metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:8712-8717.

Chen ME, Johnston D, Reyes AO, Soto CP, Babaian RJ, Troncoso P. A streamlined three-dimensional volume estimation method accurately classifies prostate tumors by volume. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1291-301

Chen CD, Welsbie DS, Tran C, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med* 2004;10:33-39.

Chevalier S, Defoy I, Lacoste J, Hamel L, Guy L, Begin LR, and Aprikian AG. Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002;189:169-179.

Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu TL, Tsao KC, Wu JT. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an Elisa and measurement in both bladder and prostate cancers *Clin Chim Acta* 2003;334:87-94

Chun FK, de la Taille A, van Poppel H, et al. Prostate cancer gene 3(PCA3): development and internal validation of a novel biopsy nomogram. *Eur Urol* 2009;56:659-67

Clark J, Merson S, Jhavar S, et al. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 2007;26:2667-2673.

Cochrane DR, et al. MicroRNA-200c mitigates invasiveness and restores sensitivity to microtubule-targeting chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther*, 2009

Cohen RJ, Glezerson G, and Haffejee Z. Prostate-specific antigen and prostate-specific acid phosphatase in neuroendocrine cells of prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1992;116:65-66.

Colombel M, Radvanyi F, Blanche M, et al. Androgen suppressed apoptosis is modified in p53 deficient mice. *Oncogene* 1995;10:1269-1274.

Colombel M, Symmans F, Gil S, et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 1993;143:390-400.

Cortes J and Baselga J, Targeting the microtubules in breast cancer beyond taxanes: the epothilones. *Oncologist* 2007;12:271-80

Cox ME, Deeb PD, Lakhani S, and Parsons SJ. Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res* 1999;59:3821-3830.

Culig Z, Hobisch A, Cronauer MV, et al. Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 1994;54:5474-5478.

Cussenot O, and Cancel-Tassin G. [Genetic susceptibility to prostate cancer]. *Med Sci* 2004;20:562-568.

Cussenot O, Villette JM, Cochand-Priollet B, and Berthon P. Evaluation and clinical value of neuroendocrine differentiation in human prostatic tumors. *Prostate Suppl* 1998;8:43-51.

D'Amico AV, Chen MH, Roehl KA, and Catalona WJ. Preoperative PSA velocity and the risk of death from prostate cancer after radical prostatectomy. *N Engl J Med* 2004;351:125-135.

Dai J, Shen R, Sumitomo M, et al. Synergistic activation of the androgen receptor by bombesin and low-dose androgen. *Clin Cancer Res* 2002;8:2399-2405.

Dan S, Tsunoda T, Kitahara O, et al. An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Res* 2002;62:1139-47

Danila DC, Fleisher M, Scher HI. Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:3903-12

Darson MF, Pacelli A, Roche P, et al. Human glandular kallikrein 2 (hK2) expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a novel prostate cancer marker. *Urology* 1997;49:857-62

de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, et al; COU-AA-301 Investigators. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2011;364:1995-2005

de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, et al; TROPIC Investigators. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet* 2010;376:1147-54

de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, et al. DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 2002; 62, 2695-8

de la Taille A, Irani J, Graefen M, et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol* 2011;185:2119-25

de Pinieux G, Legrier ME, Poirson-Bichat F, et al. Clinical and experimental progression of a new model of human prostate cancer and therapeutic approach. *Am J Pathol* 2001;159:753-764.

Debes JD, and Tindall DJ. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1488-1490.

Deeble PD, Cox ME, Frierson HF, et al Androgen-independent growth and tumorigenesis of prostate cancer cells are enhanced by the presence of PKA-differentiated neuroendocrine cells. *Cancer Res* 2007;67:3663-3672.

Demichelis F, Fall K, Perner S, et al TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 2007;26:4596-4599.

Denmeade SR, and Isaacs JT. A history of prostate cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 2002;2:389-396.

Deras IL, Aubin SM, Blase A, et al PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome. *J Urol* 2008;179:1587-92

Derry WB, et al. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry* 1997;36:3554-62

Devred F, Tsvetkov PO, Barbier P, et al. Stathmin/Op18 is a novel mediator of vinblastine activity. *FEBS Lett* 2008;582:2484-8

Don S, Verrills NM, Liaw TY, et al. Neuronal-associated microtubule proteins class III beta-tubulin and MAP2c in neuroblastoma: role in resistance to microtubule-targeted drugs. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1137-46

Dong JT, Sipe TW, Hyytinen ER, et al. PTEN/MMAC1 is infrequently mutated in pT2 and pT3 carcinomas of the prostate. *Oncogene* 1998;17:1979-1982.

Donovan MJ, Khan FM, Powell D, et al. Postoperative systems models more accurately predict risk of significant disease progression than standard risk groups and a 10-year postoperative nomogram: potential impact on the receipt of adjuvant therapy after surgery. *BJU Int* 2011 doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10398.x.

Donovan MJ, Osman I, Khan FM, et al. Androgen receptor expression is associated with prostate cancer-specific survival in castrate patients with metastatic disease. *BJU Int* 2010;105:462-7

Downing KH. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:89-111

Drachenberg DE, Elgamal AA, Rowbotham R, Peterson M, and Murphy GP. Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 1999;41:127-133.

Dumontet C and Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol* 1999;17:1061-70

Eeles RA. Genetic predisposition to prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1999;2:9-15.

Egger SE, Mueller A, Berglund RK, et al. A multi-institutional evaluation of active surveillance for low risk prostate cancer. *J Urol* 2009;181:1635-41

Erbersdobler A, Isbarn H, Steiner I, et al Predictive value of prostate-specific antigen expression in prostate cancer: a tissue microarray study. *Urology* 2009;74:1169-73

Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46(4):765-81

Feldman BJ, and Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:34-45.

Ferlini C, et al. The seco-taxane IDN5390 is able to target class III beta-tubulin and to overcome paclitaxel resistance. *Cancer Res* 2005;65:2397-405

Ferrandina G, et al. Class III beta-tubulin overexpression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12:2774-9

Fizazi K, Goessl C. Expanding horizons in metastatic prostate cancer treatment. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:625

Fracasso PM, Goldstein LJ, de Alwis DP, et al. Phase I study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar, in resistant malignancies. *Clin Cancer Res* 2004;10:7220-8

Fradet Y, Saad F, Aprikian A, et al. uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* 2004;64:311-5

Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, et al. Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA* 2005;294:433-439

Freedman H, Huzil JT, Luchko T, Ludueña RF, Tuszynski JA. Identification and characterization of an intermediate taxol binding site within microtubule nanopores and a mechanism for tubulin isotype binding selectivity. *J Chem Inf Model* 2009;49:424-36

Fujimoto N, Mizokami A, Harada S, and Matsumoto T. Different expression of androgen receptor coactivators in human prostate. *Urology* 2001;58:289-294.

Galmarini CM, et al. Class III beta-tubulin isotype predicts response in advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or docetaxel. *Clin Cancer Res* 2008;14:4511-6

Galsky MD, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of the epothilone B analog ixabepilone (BMS-247550) with or without estramustine phosphate in patients with progressive castrate metastatic prostate cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:1439-46

Gan PP, Pasquier E, Kavallaris M. Class III beta-tubulin mediates sensitivity to chemotherapeutic drugs in non small cell lung cancer. *Cancer Res* 2007;67:9356-63

Gann PH, Ma J, Giovannucci E, et al. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res* 1999;59:1225-1230.

Garnick MB. Hormonal treatment of prostate cancer. *N Engl J Med* 1999;340, 812-813.

Gascoigne KE, Taylor SS. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J Cell Sci* 2009;122:2579-85

Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 2002;20:3001-15

Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, and Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:685-704.

Giannakakou P, et al. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* 1997;272:17118-25

Gils MP, Cornel EB, Hessels D et al. Molecular PCA3 diagnostics on prostatic fluid. *Prostate* 2007; 67:881–887

Glaessgen A, Jonmarker S, Lindberg A, et al. Heat shock proteins 27, 60 and 70 as prognostic markers of prostate cancer. *APMIS* 2008;116:888-95

Gleave M, and Kelly WK. High-risk localized prostate cancer: a case for early chemotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23:8186-8191.

Gleave M, Tolcher A, Miyake H, et al. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model. *Clin Cancer Res* 1999;5:2891-2898

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58

Gray IC, Phillips SM, Lee SJ, Neoptolemos JP, Weissenbach J, and Spurr NK. Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res* 1995;55:4800-4803.

Greenwald P, and McDonald SS. Cancer Prevention: The Roles of Diet and Chemoprevention. *Cancer Control* 1997;4:118-127.

Gregory CW, He B, Johnson RT, et al. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 2001a;61:4315-4319.

Gregory CW, Johnson RT, Jr, Mohler JL, French FS, and Wilson EM. Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res* 2001b;61:2892-2898.

Gupta A, Lotan Y, Ashfaq R, et al. Predictive value of the differential expression of the urokinase plasminogen activation axis in radical prostatectomy patients *Eur Urol* 2009;55:1124-1133

Haese A, Graefen M, Steuber T, et al. Human glandular kallikrein 2 levels in serum for discrimination of pathologically organ-confined from locally-advanced prostate cancer in total PSA-levels below 10ng/ml. *Prostate* 2001;49:101-109

Haese A, de la Taille A, van Poppel H, et al. Clinical Utility of the PCA3 Urine Assay in European Men Scheduled for Repeat Biopsy. *Eur Urol* 2008; 26

Haldar S, Basu A, Croce CM. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res* 1997;57:229-33

Hall A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:5-14

Hansson V, Weddington SC, Petrusz P, Ritzen EM, Nayfeh SN, and French FS. FSH stimulation of testicular androgen binding protein (ABP): comparison of ABP response and ovarian augmentation. *Endocrinology* 1975;97:469-473.

Harden SV, Sanderson H, Goodman SN, et al. Quantitative GSTP1 methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies J Natl Cancer Inst 2005;95:1634-1637

Hari M, et al. Expression of class III beta-tubulin reduces microtubule assembly and confers resistance to paclitaxel. Cell Motil Cytoskeleton 2003;56:45-56

Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, Clements JA. Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. J Biol Chem 2000;275:37397-406

He WW, Sciavolino PJ, Wing J, et al. A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. Genomics 1997;43:69-77.

Heemers HV, and Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. Endocr Rev 2007;28:778-808.

Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, et al; European Association of Urology. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. Eur Urol;59:61-71

Heinlein CA, and Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. Endocr Rev 2002;23:175-200.

Heinlein CA, and Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. Endocr Rev 2004;25:276-308.

Hellerstedt BA, and Pienta KJ. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. CA Cancer J Clin 2002;52:154-179.

Henttu P, Liao SS, and Vihko P. Androgens up-regulate the human prostate-specific antigen messenger ribonucleic acid (mRNA), but down-regulate the prostatic acid phosphatase mRNA in the LNCaP cell line. Endocrinology 1992;130:766-772.

Hermans KG, van Marion R, van Dekken H, Jenster G, van Weerden WM, Trapman J. TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-

dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:10658-63

Hessels D, Klein Gunnewiek JM, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003;44:8-15

Hessels D, Klein Gunnewiek JM, et al. DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 2003;44:8-15
Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol* 2004;46:182-6

Hessels D et al. Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007a;13:5103-5108

Hessels D, Smit FP, Verhaegh GW, Witjes JA, Cornel EB, Schalken JA. Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer *Clin Cancer Res* 2007b;13: 5103-5108

Hessels D, van Gils MP, van Hooij O, et al. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate* 2010;70:10-6

Hirano D, Okada Y, Minei S, Takimoto Y, and Nemoto N. Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *Eur Urol* 2004;45:586-592

Hoque MO, Topaloglu O, Begum S, et al. Quantitative methylation specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects *J Clin Oncol* 2005;23:6569-6575

Horwitz SB, et al. Taxol: mechanisms of action and resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1986;466:733-44

Huang H, Zegarra-Moro OL, Benson D, and Tindall DJ. Androgens repress Bcl-2 expression via activation of the retinoblastoma (RB) protein in prostate cancer cells. *Oncogene* 2004;23:2161-2176.

Huggins C, and Hodges CV. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin* 1972;22:232-240.

Humphrey PA, Keetch DW, Smith DS, Shepherd DS, Catalona WJ. Prospective characterization of pathological features of prostatic carcinomas detected via serum prostate specific antigen based screening. *J Urol* 1996 ;155 :816

Huss WJ, Gray DR, Tavakoli K, et al. Origin of androgen-insensitive poorly differentiated tumors in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Neoplasia* 2007;9:938-950.

Huss WJ, Gregory CW, and Smith GJ. Neuroendocrine cell differentiation in the CWR22 human prostate cancer xenograft: association with tumor cell proliferation prior to recurrence. *Prostate* 2004;60:91-97.

Hussain A, et al. Phase II trial of weekly patupilone in patients with castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol* 2009;20:492-7

Ito T, Yamamoto S, Ohno Y, Namiki K, Aizawa T, Akiyama A, and Tachibana M. Up-regulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer after androgen deprivation therapy, degree and androgen independence. *Oncol Rep* 2001;8:1221-1224.

Irani J, Salomon L, Soulié M, et al. Urinary/serum prostate-specific antigen ratio: comparison with free/total serum prostate-specific antigen ratio in improving prostate cancer detection *Urology* 2005;65:533-537

Jaffe JM, Malkowicz SB, Walker AH, et al Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors. *Cancer Res* 2000;60:1626-1630.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-300

Jentzmik F, Stephan C, Schrader M, et al. Sarcosine in urine after digital rectal examination fails as a marker in prostate cancer detection and identification of aggressive tumors. *Eur Urol* 2010;58:12–18

Jerónimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer *Urology* 2002;60:1131-1135

Jia L, Choong CS, Ricciardelli C, Kim J, Tilley WD, and Coetzee GA. Androgen receptor signaling: mechanism of interleukin-6 inhibition. *Cancer Res* 2004;64:2619-2626.

Jiborn T, Bjartell A, and Abrahamsson PA. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma during hormonal treatment. *Urology* 1998;51:585-589.

Jin RJ, Wang Y, Masumori N, et al. NE-10 neuroendocrine cancer promotes the LNCaP xenograft growth in castrated mice. *Cancer Res* 2004;64:5489-5495.

Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, et al. Kinetics of neuroendocrine differentiation in an androgen-dependent human prostate xenograft model. *Am J Pathol* 1999;154:543-551.

Kaisary AV, Tyrrell CJ, Beacock C, Lunglmayr G, and Debruyne F. A randomised comparison of monotherapy with Casodex 50 mg daily and castration in the treatment of metastatic prostate carcinoma. Casodex Study Group. *Eur Urol* 1995;28:215-222.

Kamath K, et al. BetaIII-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *J Biol Chem* 2005;280:12902-7

Kantoff PW, Halabi S, Conaway M, et al. Hydrocortisone with or without mitoxantrone in men with hormone-refractory prostate cancer: results of the cancer and leukemia group B 9182 study. *J Clin Oncol* 1999;17:2506-2513

Kanzaki A, Toi M, Nakayama K, Bando H et al. Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92:452-8

Karam JA, Svatek RS, Karakiewicz PI, et al. Use of preoperative plasma endoglin for prediction of lymph node metastasis in patients with clinically localized prostate cancer *Clin Cancer Res* 2008;14:1418-1422

Katsetos CD, Dráberová E, Legido A, Dumontet C, Dráber P. Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III beta-tubulin. *J Cell Physiol* 2009;221:505-13

Katsetos CD, Herman MM, and Mork SJ, Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;55:77-96

Katsetos CD, et al. Differential distribution of the neuron-associated class III beta-tubulin in neuroendocrine lung tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:535-44

Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:194-204

Kavallaris M, Burkhardt CA, and Horwitz SB. Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br J Cancer*, 1999;80:1020-5

Kavallaris M, Kuo DY, Burkhardt CA, et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Inves*. 1997;100:1282-93

Kavanaugh CJ, Trumbo PR, and Ellwood KC. The U.S. Food and Drug Administration's evidence-based review for qualified health claims: tomatoes, lycopene, and cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007;99, 1074-1085.

Kibel AS, Rosenbaum E, Kattan MW, et al. Adjuvant weekly docetaxel for patients with high risk prostate cancer after radical prostatectomy: a multi-institutional pilot study. *J Urol* 2007;177:1777-81

King CR, Freedland SJ, Terris MK, et al. Optimal timing, cutoff, and method of calculation of preoperative prostate-specific antigen velocity to predict relapse after prostatectomy: a report from SEARCH. *Urology* 2007;69:732-7

Klein EA, and Thompson IM. Update on chemoprevention of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2004;14:143-149.

Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, Loblaw A. Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:126-31

Ko LJ, and Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996;10:1054-1072.

Kumar-Sinha C, Tomlins SA, and Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:497-511.

Landers KA, et al. Use of multiple biomarkers for a molecular diagnosis of prostate cancer. *Int J Cancer* 2005;114: 950-6

Lawrentschuk N, Fernandes K, Bell D, Barkin J, Fleshner N. Efficacy of a second line luteinizing hormone-releasing hormone agonist after advanced prostate cancer biochemical recurrence. *J Urol* 2011;185:848-54

Laxman B et al. A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:645–649

Laxman B, Tomlins SA, Mehra R, et al. Non invasive detection of TMPRSS2—ERG fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer *Neoplasia* 2006;8:885-888

Lee LF, Guan J, Qiu Y, and Kung HJ. Neuropeptide-induced androgen independence in prostate cancer cells: roles of nonreceptor tyrosine kinases Etk/Bmx, Src, and focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 2001;21:8385-8397.

Lei Q, Jiao J, Xin L, et al. NKX3.1 stabilizes p53, inhibits AKT activation, and blocks prostate cancer initiation caused by PTEN loss. *Cancer Cell* 2006;9:367-378.

Leinonen KA, Tolonen TT, Bracken H, et al. Association of SPINK1 expression and TMPRSS2:ERG fusion with prognosis in endocrine-treated prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:2845-51

Lexander H, Palmberg C, Auer G, et al. Proteomic analysis of protein expression in prostate cancer. *Anal Quant Cytol Histol* 2005;27:263-72

Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu HM. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ* 2005;12:292-303

Li R, Wheeler T, Dai H, Frolov A, Thompson T, Ayala G. High level of androgen receptor is associated with aggressive clinicopathologic features and decreased biochemical recurrence-

free survival in prostate: cancer patients treated with radical prostatectomy. *Am J Surg Pathol* 2004;28:928-34

Lintula S, Stenman J, Bjartell A, Nordling S, Stenman UH. Relative concentrations of hK2/PSA mRNA in benign and malignant prostatic tissue. *Prostate* 2005;63:324-9

Liu B, Staren E, Iwamura T, Appert H, Howard J. Taxotere resistance in SUIT Taxotere resistance in pancreatic carcinoma cell line SUIT 2 and its sublines. *World J Gastroenterol* 2001;7:855-9

Lodes MJ, Caraballo M, Suciú D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009;4:e6229

Lu Q and Luduena RF. Removal of beta III isotype enhances taxol induced microtubule assembly. *Cell Struct Funct* 1993;18:173-82

Lubeck DP, Litwin MS, Henning JM, et al. The CaPSURE database: a methodology for clinical practice and research in prostate cancer. CaPSURE Research Panel. *Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor. Urology* 1996;48:773-777.

Lucia MS, Epstein JI, Goodman PJ, et al. Finasteride and high-grade prostate cancer in the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1375-83

Ludueña RF. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol* 1998;178:207-75

Magnani M, et al. The betaI/betaIII-tubulin isoforms and their complexes with antimetabolic agents. Docking and molecular dynamics studies. *Febs J* 2006;273:3301-10

Makarov DV, Isharwal S, Sokoll LJ, et al. Pro-prostate-specific antigen measurements in serum and tissue are associated with treatment necessity among men enrolled in expectant management for prostate cancer *Clin Cancer Res* 2009;15:7316-7321

Marcelli M, Ittmann M, Mariani S, et al. Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:944-949.

Marks LS, Fradet Y, Deras IL, et al. PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology* 2007;69:532-5

Martello LA, Verdier-Pinard P, Shen HJ, et al. Elevated levels of microtubule destabilizing factors in a Taxol-resistant/dependent A549 cell line with an alpha-tubulin mutation. *Cancer Res* 2003;63:1207-13

Massard C, Fizazi K. Targeting continued androgen receptor signaling in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17:3876-83

McDonnell TJ, Navone NM, Troncoso P, et al. Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer. *J Urol* 1997;157:569-574.

McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 1992;52:6940-6944.

McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res* 1999;59:4291-6

Meng FJ, Shan A, Jin L, Young CYF. The expression of a variant prostate specific antigen in human prostate. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2002;11:305-309

Mhaidat NM, Thorne RF, de Bock CE, Zhang XD, Hersey P. Melanoma cell sensitivity to Docetaxel-induced apoptosis is determined by class III beta-tubulin levels. *FEBS Lett* 2008;582:267-72

Michalaki V, Syrigos K, Charles P, Waxman J. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer *Br J Cancer* 2004;90:2312-2316

Mitelman F, Johansson B, and Mertens F. Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. *Nat Genet* 2004;36:331-334.

Miyake H, Tolcher A, and Gleave ME. Antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides inhibit progression to androgen-independence after castration in the Shionogi tumor model. *Cancer Res* 1999;59:4030-4034.

Montgomery B, Lavori P, Garzotto M, et al. Veterans Affairs Cooperative Studies Program study 553: Chemotherapy after prostatectomy, a phase III randomized study of prostatectomy versus prostatectomy with adjuvant docetaxel for patients with high-risk, localized prostate cancer. *Urology* 2008;72:474-480

Monzo M, et al. Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *J Clin Oncol*,1999;17:1786-93

Morgan TM, Koreckij TD, Corey E. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9:237-49

Mori R, et al. Gene profiling and pathway analysis of neuroendocrine transdifferentiated prostate cancer cells. *Prostate* 2009;69:12-23

Mozzetti S, Ferlini C, Concolino P, et al. Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005;11:298-305

Muller H, Haug U, Rothenbacher D, Stegmaier C, Brenner H. Evaluation of serum and urinary myeloid related protein-14 as a marker for early detection of prostate cancer *J Urol* 2008;180:1309-1312

Multigner L, Ndong JR, Giusti A, et al. Chlordecone exposure and risk of prostate cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:3457-62

Murphy M, Hinman A, Levine AJ. Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein. *Genes Dev* 1996;10:2971-80

Nakada SY, di Sant'Agnese PA, Moynes RA, et al. The androgen receptor status of neuroendocrine cells in human benign and malignant prostatic tissue. *Cancer Res* 1993;53:1967-1970.

Nakanishi H, Groskopf J, Fritsche HA, et al. PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance. *J Urol* 2008;179:1804-9

Nakashima J, Tachibana M, Horiguchi Y, et al. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:2702-2706.

Nazareth LV, Stenoien DL, Bingman WE, 3rd, et al. A C619Y mutation in the human androgen receptor causes inactivation and mislocalization of the receptor with concomitant sequestration of SRC-1 (steroid receptor coactivator 1). *Mol Endocrinol* 1999;13, 2065-2075.

Nelson WG, De Marzo AM, and Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349:366-381.

Neto AS, Tobias-Machado M, Wroclawski ML, et al. Her-2/neu expression in prostate adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *J Urol* 2010;184:842-50

Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, et al. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer *Br J Cancer* 2009;100:1603-1607

Nogales E, et al. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 1999;96:79-88

O'Brien MF, Cronin AM, Fearn PA, et al. Pretreatment prostate-specific antigen (PSA) velocity and doubling time are associated with outcome but neither improves prediction of outcome beyond pretreatment PSA alone in patients treated with radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2009;27:3591-7

Ohishi Y, et al. Expression of beta-tubulin isotypes in human primary ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2007;105:586-92

Ouyang B, Bracken B, Burke B, Chung E, Liang J, Ho SM. A duplex quantitative polymerase chain reaction assay based on quantification of alpha-methylacyl-CoA racemase transcripts and prostate cancer antigen 3 in urine sediments improved diagnostic accuracy for prostate cancer *J Urol* 2009;181:2508-2513

Ouyang X, Jessen WJ, Al-Ahmadie H, et al. Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:2132-44

Palma D, Tyldesley S, Blood P, Liu M, Morris J, Pickles T; Prostate Cohort Outcomes Initiative. Pretreatment PSA velocity as a predictor of disease outcome following radical radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:1425-9

Panda D, Miller HP, Banerjee A, Ludueña RF, Wilson L. Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11358-62

Paradiso A, et al. Biomarkers predictive for clinical efficacy of taxol-based chemotherapy in advanced breast cancer. *Ann Oncol* 2005;16:14-19

Pasquier E, Kavallaris M. Microtubules: a dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life*. 2008;60:165-70

Patel DA, Presti JC Jr, McNeal JE, Gill H, Brooks JD, King CR. Preoperative PSA velocity is an independent prognostic factor for relapse after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2005;23:6157-62

Paul R, and Breul J. Antiandrogen withdrawal syndrome associated with prostate cancer therapies: incidence and clinical significance. *Drug Saf* 2000;23:381-390.

Paule B, Terry S, Kheuang L, Soyeux P, Vacherot F, and de la Taille A. The NF-kappaB/IL-6 pathway in metastatic androgen-independent prostate cancer: new therapeutic approaches? *World J Urol* 2007;25:477-489

Penson RT, Oliva E, Skates SJ, et al. Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynecol Oncol* 2004;93:98-106

Perdonà S, Cavadas V, Di Lorenzo G, et al. Prostate cancer detection in the "grey area" of prostate-specific antigen below 10 ng/ml: head-to-head comparison of the updated PCPT calculator and Chun's nomogram, two risk estimators incorporating prostate cancer antigen 3. *Eur Urol* 2011;59:81-7

Perner S, Demichelis F, Beroukhir R, Schmidt FH, et al. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:8337-8341.

Perner S, Hofer MD, Kim R, et al. Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression. *Hum Pathol* 2007;38:696-701

Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1513-1520.

Peyromaure M. Pro PSA: a new prostate cancer marker *Prog Urol* 2004;14:8-11

Ploussard G, Agamy MA, Alenda O, et al. Impact of positive surgical margins on prostate-specific antigen failure after radical prostatectomy in adjuvant treatment-naïve patients. *BJU Int* 2011a;107:1748-54

Ploussard G, de la Taille A. Urine biomarkers in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2010;7:101-9

Ploussard G, Epstein JI, Montironi R, et al. The contemporary concept of significant versus insignificant prostate cancer. *Eur Urol* 2011b;60:291-303

Ploussard G, Haese A, Van Poppel H, et al. The prostate cancer gene 3 (PCA3) urine test in men with previous negative biopsies: does free-to-total prostate-specific antigen ratio influence the performance of the PCA3 score in predicting positive biopsies? *BJU Int* 2010c;106:1143-7

Ploussard G, Paule B, Salomon L, et al. Pilot trial of adjuvant paclitaxel plus androgen deprivation for patients with high-risk prostate cancer after radical prostatectomy: results on toxicity, side effects and quality-of-life. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010a;13:97-101

Ploussard G, Salomon L, Xylinas E, et al. Pathological findings and prostate specific antigen outcomes after radical prostatectomy in men eligible for active surveillance--does the risk of misclassification vary according to biopsy criteria? *J Urol* 2010b;183:539-44

Ploussard G, Xylinas E, Durand X, et al. Magnetic resonance imaging does not improve the prediction of misclassification of prostate cancer patients eligible for active surveillance when the most stringent selection criteria are based on the saturation biopsy scheme. *BJU Int* 2011c;108:513-7

Ploussard G, Xylinas E, Salomon L, et al. The role of biopsy core number in selecting prostate cancer patients for active surveillance. *Eur Urol* 2009;56:891-8

Po'uha ST, Shum MS, Goebel A, Bernard O, Kavallaris M. LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene* 2010;29:597-607

Pouessel D, Gallet B, Bibeau F, et al. Liver metastases in prostate carcinoma: clinical characteristics and outcome. *BJU Int* 2007;99:807-811.

Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, and Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999;281:1591-1597

Pusztai L, Wagner P, Ibrahim N, et al. Phase II study of tariquidar, a selective P-glycoprotein inhibitor, in patients with chemotherapy-resistant, advanced breast carcinoma. *Cancer* 2005;10:682-91

Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, and Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 1995;55:4438-4445

Rana S, Maples PB, Senzer N, Nemunaitis J. Stathmin 1: a novel therapeutic target for anticancer activity. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1461-70

Ranganathan S. et al. Immunohistochemical analysis of beta-tubulin isotypes in human prostate carcinoma and benign prostatic hypertrophy. *Prostate* 1997;30:263-8

Ranganathan S. et al. Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* 1998a;77:562-6

Ranganathan S. et al. Cloning and sequencing of human betaIII-tubulin cDNA: induction of betaIII isotype in human prostate carcinoma cells by acute exposure to antimicrotubule agents. *Biochim Biophys Acta* 1998b;1395:237-45

Ranganathan S, et al. Modulation of endogenous beta-tubulin isotype expression as a result of human beta(III)cDNA transfection into prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* 2001;85:735-40

Raspaglio G, et al. Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1alpha binding to its 3' flanking region. *Gene* 2008;409:100-8

Ravery V, Chastang C, Toublanc M, Boccon-Gibod L, Delmas V, and Boccon-Gibod L. Percentage of cancer on biopsy cores accurately predicts extracapsular extension and biochemical relapse after radical prostatectomy for T1-T2 prostate cancer. *Eur Urol* 2000;37:449-455.

Raynaud JP. Prostate cancer risk in testosterone-treated men. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;102:261-266.

Raynaud JP, Bonne C, Bouton MM, Lagace L, and Labrie F. Action of a non-steroid anti-androgen, RU 23908, in peripheral and central tissues. *J Steroid Biochem* 1979;11:93-99.

Rehman I, Azzouzi AR, Catto JW, et al. Proteomic analysis of voided urine after prostatic massage from patients with prostate cancer: a pilot study *Urology* 2004;64:1238-1243

Reichardt JK, Makridakis N, Henderson BE, Yu MC, Pike MC, and Ross RK. Genetic variability of the human SRD5A2 gene: implications for prostate cancer risk. *Cancer Res* 1995;55:3973-3975.

Renshaw AA, Richie JP, Loughlin KR, Jiroutek M, Chung A, D'Amico AV. Maximum diameter of prostatic carcinoma is a simple, inexpensive, and independent predictor of prostate-specific antigen failure in radical prostatectomy specimens. Validation in a cohort of 434 patients. *Am J Clin Pathol* 1999;111:641-4

Rittmaster RS. Chemoprevention of prostate cancer. *Acta Oncol* 2011;50:127-36

Rivera E, Lee J, and Davies A. Clinical development of ixabepilone and other epothilones in patients with advanced solid tumors. *Oncologist* 2008;13:1207-23

Rocchi P, Muracciole X, Fina F, et al. Molecular analysis integrating different pathways associated with androgen-independent progression in LuCaP 23.1 xenograft. *Oncogene* 2004;23:9111-9119.

Rodriguez OC, Schaefer AW, Mandato CA, Forscher P, Bement WM, Waterman-Storer CM. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol* 2003;5:599-609

Roemeling S, Roobol MJ, Postma R, et al. Management and survival of screen-detected prostate cancer patients who might have been suitable for active surveillance. *Eur Urol* 2006;50:475-82

Rosenberg JE, et al. Phase I study of ixabepilone, mitoxantrone, and prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer previously treated with docetaxel-based therapy: a study of the department of defense prostate cancer clinical trials consortium. *J Clin Oncol* 2009;27:2772-8

Ross AE, Loeb S, Landis P, et al. Prostate-specific antigen kinetics during follow-up are an unreliable trigger for intervention in a prostate cancer surveillance program. *J Clin Oncol* 2010;28:2810-6

Rossi PJ, Urbanic J, Clark PE, McCullough DL, Lee WR. Pretreatment prostate-specific antigen velocity is associated with freedom from biochemical recurrence of prostate cancer after low-dose-rate prostate brachytherapy alone. *Brachytherapy* 2008;7:286-9

Rouprêt M, Hupertan V, Yates DR, et al. Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage *Clin Cancer Res* 2007;13:1720-1725

Rouzier R, Rajan R, Wagner P, et al. Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8315-20

Roy R, Louis G, Loughlin KR, et al. Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species *Clin Cancer Res* 2008;14:6610-6617

Rubin MA, Maher CA, Chinnaiyan AM. Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:3659-68

Saini S, Majid S, Yamamura S, et al. Regulatory Role of mir-203 in Prostate Cancer Progression and Metastasis. *Clin Cancer Res* 2011;17:5287-98

Salami SS, Schmidt F, Laxman B, et al. Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol Oncol* 2011

Sale S, Sung R, Shen P, et al. Conservation of the class I beta-tubulin gene in human populations and lack of mutations in lung cancers and paclitaxel-resistant ovarian cancers. *Mol Cancer Ther* 2002;1:215-25

Salomon L, Azria D, Bastide C, et al; Oncology Committee of the French Association of Urology (CCAFU). Recommendations Onco-Urology 2010: Prostate cancer. *Prog Urol* 2010;20:S217-51

Saramaki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, and Visakorpi T. TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res* 2008;14:3395-3400.

Saussede-Aim J. et al. Beta3-tubulin is induced by estradiol in human breast carcinoma cells through an estrogen-receptor dependent pathway. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009;66:378-88

Scher HI, Beer TM, Higano CS, et al; Prostate Cancer Foundation/Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trials Consortium. Antitumour activity of MDV3100 in castration-resistant prostate cancer: a phase 1-2 study. *Lancet* 2010;375:1437-46

Scher HI, Kelly WM, Zhang ZF, et al. Post-therapy serum prostate-specific antigen level and survival in patients with androgen-independent prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:244-51

Schneider J, Romero H. Correlation of P-glycoprotein overexpression and cellular prognostic factors in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples from breast cancer patients. *Anticancer Res* 1995;15:1117-21

Schostak M, Schwall GP, Poznanović S, et al. Annexin A3 in urine: a highly specific non invasive marker for prostate cancer early detection *J Urol* 2009;181:343-353

Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ et al. Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study. *N Engl J Med* 2009;360:1320-8

Seruga B, Ocana A, Tannock IF. Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:12-23

Setlur SR, et al. Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:815-25

Sève P, et al. Expression of class III β -tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:5481-6

Sève P and Dumontet C. Is class III β -tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents? *Lancet Oncol* 2008;9:168-75

Sève P, Dumontet C. Chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2005;5:73-88

Sève P, et al. Protein abundance of class III β -tubulin but not $\Delta 2$ - α -tubulin or tau is related to paclitaxel response in carcinomas of unknown primary site. *Anticancer Res* 2008;28:1161-7

Sève P. et al. Class III β -tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. *Mol Cancer Ther* 2005b;4:2001-7

Sève P. et al. Class III β -tubulin expression and benefit from adjuvant cisplatin/vinorelbine chemotherapy in operable non-small cell lung cancer: analysis of NCIC JBR.10. *Clin Cancer Res* 2007;13:994-9

Shaneyfelt T, Husein R, Bubley G, and Mantzoros CS. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2000;18, 847-853.

Shariat SF, Kattan MW, Traxel E, et al. Association of pre- and postoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression *Clin Cancer Res* 2004;10:1992-1999

Shi XB, Ma AH, Xia L, Kung KJ, and de Vere White RW. Functional analysis of 44 mutant androgen receptors from human prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:1496-1502.

Shibata A, Garcia MI, Cheng I, et al. Polymorphisms in the androgen receptor and type II 5 alpha-reductase genes and prostate cancer prognosis. *Prostate* 2002;52:269-278.

Silva J, Garcia JM, Pena C, et al. Implication of polycomb members Bmi-1, Mel-18, and Hpc-2 in the regulation of p16INK4a, p14ARF, h-TERT, and c-Myc expression in primary breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006;12:6929-6936.

Smith JR, Freije D, Carpten JD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 1996;274:1371-1374.

Soller MJ, Isaksson M, Elfving P, Soller W, Lundgren R, and Panagopoulos I. Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45:717-719.

Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, et al. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression *Nature* 2009;457:910-914

Staerman F, Peyromaure M, Irani J, et al; CCAFU. Active surveillance for localized prostate cancer. *Prog Urol* 2011;21:448-54

Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM, Sigal BM, Johnstone IM. Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer. *JAMA* 1999;281:1395-400

Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, and Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;17:337-347.

Steinsapir J, Socci R, and Reinach P. Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;179:90-96.

Stephan C, Kahrs AM, Cammann H, et al. A [-2]proPSA-based artificial neural network significantly improves differentiation between prostate cancer and benign prostatic diseases Prostate 2009 ; 69 (2) : 198-207

Stephenson AJ, Scardino PT, Eastham JA, et al. Postoperative nomogram predicting the 10-year probability of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. J Clin Oncol 2005;23:7005-12

Su D, Smith SM, Preti M, et al. Stathmin and tubulin expression and survival of ovarian cancer patients receiving platinum treatment with and without paclitaxel. Cancer 2009;115:2453-63

Suardi N, Capitanio U, Chun FK, et al. Currently used criteria for active surveillance in men with low-risk prostate cancer: an analysis of pathologic features. Cancer 2008;113:2068-72

Sutcliffe P, Hummel S, Simpson E, et al. Use of classical and novel biomarkers as prognostic risk factors for localised prostate cancer: a systematic review. Health Technol Assess 2009;13

Svatek RS, Karam JA, Roehrborn CG, Karakiewicz PI, Slawin KM, Shariat SF. Preoperative plasma endoglin levels predict biochemical progression after radical prostatectomy Clin Cancer Res 2008;14:3362-3366

Svatek RS, Jeldres C, Karakiewicz PI, et al. Pre-treatment biomarker levels improve the accuracy of post-prostatectomy nomogram for prediction of biochemical recurrence Prostate 2009;69:886-894

Tanaka S, Nohara T, Iwamoto M, et al. Tau expression and efficacy of paclitaxel treatment in metastatic breast cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2009;64:341-6

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N Engl J Med 2004;351:1502-1512.

Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, et al. Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. J Clin Oncol 1996;14:1756-1764.

Taplin ME, Bubley GJ, Ko YJ. Selection for androgen receptor mutations in prostate cancers treated with androgen antagonist. *Cancer Res* 1999;59:2511-2515.

Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, et al. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat Genet* 2001;27:172-180.

Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349:215-24

Thuret R, Chantrel-Groussard K, Azzouzi AR, et al. Clinical relevance of genetic instability in prostatic cells obtained by prostatic massage in early prostate cancer *Br J Cancer* 2005;92:236-240

Tinzl M, Marberger M, Horvath S, Chypre C. DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol* 2004;46:182-6

Titus MA, Gregory CW, Ford OH 3rd, Schell MJ, Maygarden SJ, and Mohler JL. Steroid 5alpha-reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:4365-4371.

Titus MA, Schell MJ, Lih FB, Tomer KB, Mohler JL. Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:4653-7

Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 2007;448:595-599.

Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 2008a;10:177-188.

Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, et al. TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:3396-3400.

Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310:644-648.

Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, et al. The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers. *Cancer Cell* 2008b;13:519-528.

Tommasi S, Mangia A, Lacalamita R, Bellizzi A, Fedele V, Chiriatti A, Thomssen C, Kendzierski N, Latorre A, Lorusso V, Schittulli F, Zito F, Kavallaris M, Paradiso A et al. Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: the role of beta-tubulins. *Int J Cancer* 2007;120:2078-85

Tosoian JJ, Loeb S, Kettermann A, et al. Accuracy of PCA3 measurement in predicting short term biopsy progression in an active surveillance program. *J. Urol* 2010;184:396-7

Tosoian JJ, Trock BJ, Landis P, et al. Active surveillance program for prostate cancer: an update of the Johns Hopkins experience. *J Clin Oncol* 2011;29:2185-90

Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, and Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984;224:1403-1406

Tsukamoto F, Shiba E, Taguchi T, et al. Immunohistochemical Detection of P-glycoprotein in Breast Cancer and Its Significance as a Prognostic Factor. *Breast Cancer* 1997 ;4:259-263

Uchida K, Masumori N, Takahashi A, et al. Murine androgen-independent neuroendocrine carcinoma promotes metastasis of human prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate* 2006;66:536-545.

Ueda T, Bruchovsky N, and Sadar MD. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2002;277:7076-7085.

Umbehr M, Bachmann LM, Held U, et al. Combined magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopy imaging in the diagnosis of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 2009;55:575-90

Urano N, et al. Clinical significance of class III beta-tubulin expression and its predictive value for resistance to docetaxel-based chemotherapy in gastric cancer. *Int J Oncol* 2006;28:375-81

Vaarala MH, Porvari K, Kyllonen A, Lukkarinen O, and Vihko P. The TMPRSS2 gene encoding transmembrane serine protease is overexpressed in a majority of prostate cancer patients: detection of mutated TMPRSS2 form in a case of aggressive disease. *Int J Cancer* 2001;94:705-710.

van As NJ, de Souza NM, Riches SF, et al. A Study of Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging in Men with Untreated Localised Prostate Cancer on Active Surveillance. *Eur Urol* 2009;56:981-988

van As NJ, Norman AR, Thomas K, et al. Predicting the probability of deferred radical treatment for localised prostate cancer managed by active surveillance. *Eur Urol* 2008;54:1297-305

van den Bergh RC, Roemeling S, Roobol MJ, Wolters T, Schröder FH, Bangma CH. Prostate-specific antigen kinetics in clinical decision-making during active surveillance for early prostate cancer--a review. *Eur Urol* 2008;54:505-16

van den Bergh RCN, Roemeling S, Roobol MJ, et al. Outcomes of men with screen-detected prostate cancer eligible for active surveillance who were managed expectantly. *Eur Urol* 2009;55:1-8

van der Kwast TH, Schalken J, Ruizeveld de Winter JA, et al. Androgen receptors in endocrine-therapy-resistant human prostate cancer. *Int J Cancer* 1991;48:189-193.

Van Gils MP, Hessels D, Hulsbergen-van de Kaa CA, et al. Detailed analysis of histopathological parameters in radical prostatectomy specimens and PCA3 urine test results. *Prostate* 2008;68:1215-22

Van Gils MP, Hessels D, van Hooij O, et al. The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. *Clin Cancer Res* 2007;13:939-43

Varambally S, Laxman B, Mehra R, et al. Golgi protein GOLM1 is a tissue and urine biomarker of prostate cancer Neoplasia 2008;10:1285-1294

Veldscholte J, Berrevoets CA, Ris-Stalpers C, et al. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:665-669.

Veltri RW, Isharwal S, Miller MC, et al. Long-term assessment of prostate cancer progression free survival: evaluation of pathological parameters, nuclear shape and molecular biomarkers of pathogenesis. *Prostate* 2008;68:1806-15

Verdier-Pinard P, Pasquier E, Xiao H et al. Tubulin proteomics: towards breaking the code. *Anal Biochem* 2009;38:197-206

Verrills NM, Po'uha ST, Liu ML, et al. Alterations in gamma-actin and tubulin-targeted drug resistance in childhood leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1363-74

Vickers AJ, Savage C, O'Brien MF, Lilja H. Systematic review of pretreatment prostate-specific antigen velocity and doubling time as predictors for prostate cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:398-403

Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995;9:401-406.

Vlaeminck-Guillem V, Devonec M, Colombel M, Rodriguez-Lafrasse C, Decaussin-Petrucci M, Ruffion A. Urinary PCA3 score predicts prostate cancer multifocality. *J Urol* 2011;185:1234-9

Wallen MJ, Linja M, Kaartinen K, Schleutker J, and Visakorpi T. Androgen receptor gene mutations in hormone-refractory prostate cancer. *J Pathol* 1999;189:559-563.

Wang J, Cai Y, Ren C, and Ittmann M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66:8347-8351.

Wang Q, Horiatis D, and Pinski J. Inhibitory effect of IL-6-induced neuroendocrine cells on prostate cancer cell proliferation. *Prostate* 2004b;61:253-259.

Whitman EJ, Groskopf J, Ali A, et al. PCA3 score before radical prostatectomy predicts extracapsular extension and tumor volume. *J Urol* 2008;180:1975-8

Wikstrom P, Lissbrant IF, Stattin P, Egevad L, Bergh A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer *Prostate* 2002;51:268-275

Wo JY, Chen MH, Nguyen PL, et al. Evaluating the combined effect of comorbidity and prostate-specific antigen kinetics on the risk of death in men after prostate-specific antigen recurrence. *J Clin Oncol* 2009;27:6000-5

Woodson K, O'Reilly KJ, Hanson JC, Nelson D, Walk EL, Tangrea JA. The usefulness of the detection of GSTP1 methylation in urine as a biomarker in the diagnosis of prostate cancer *J Urol* 2008;179:508-511

Wright ME, Tsai MJ, and Aebbersold R. Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Mol Endocrinol* 2003;17:1726-1737.

Wu JT, Wu TL, Chang CP, Tsao KC, and Sun CF. Different patterns of serum chromogranin A in patients with prostate cancer with and without undergoing hormonal therapy. *J Clin Lab Anal* 1999;13:308-311.

Xylinas E, Durand X, Campeggi A, et al. Pathological findings after radical prostatectomy in men eligible for active surveillance (French trial SURACAP): is the misclassification rate acceptable?]. *Prog Urol* 2011;21:264-9

Xu J, Meyers D, Freije D, et al. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet* 1998;20:175-179.

Yeh S, and Chang C. Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5517-5521

Yeh JJ, Hsu WH, Wang JJ, Ho ST, Kao A. Predicting chemotherapy response to paclitaxel-based therapy in advanced non-small-cell lung cancer with P-glycoprotein expression. *Respiration* 2003;70:32-5

Yuan TC, Veeramani S, Lin FF, et al. Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:151-167.

Yuan TC, Veeramani S, and Lin MF. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:531-547

Zhang CC, Yang JM, Bash-Babula J, et al. DNA damage increases sensitivity to vinca alkaloids and decreases sensitivity to taxanes through p53-dependent repression of microtubule-associated protein 4. *Cancer Res* 1999;59:3663-70

Zhang HL, Yang LF, Zhu Y, et al. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate* 2011;71:326-31

Zhao XY, Boyle B, Krishnan AV, Navone NM, Peehl DM, and Feldman D. Two mutations identified in the androgen receptor of the new human prostate cancer cell line MDA PCa 2a. *J Urol* 1999;162:2192-2199.

Introduction : La pertinence clinique de la recherche de nouveaux biomarqueurs repose sur l'amélioration de la prise en charge des malades. Dans le cancer de prostate (CaP), ce biomarqueur sera pertinent s'il permet d'identifier les patients à fort risque de récurrence pour lesquels une thérapie adjuvante pourrait améliorer la survie, s'il permet de sélectionner les CaP non significatifs candidats à une surveillance active, ou bien s'il permet de prédire la réponse au traitement proposé, notamment au stade de la résistance à la castration, et ainsi de sélectionner le meilleur traitement médical pour un patient donné. Les deux biomarqueurs rapportés dans cette thèse ont été étudiés en gardant à l'esprit ces axes cliniques: un marqueur pronostique de la significativité de la maladie (score urinaire PCA3) dès le diagnostic et la décision de traitement, afin d'identifier les CaP non significatifs, meilleurs candidats à la surveillance active ; et un marqueur prédictif de la sensibilité au docétaxel (β -tubuline de classe III), permettant de décrypter les voies moléculaires impliquées à la fois dans la résistance à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie.

Objectifs :

- (i) Etudier la valeur pronostique de la β III-tubuline au stade de cancer localisé hormono-naïf
- (ii) Etudier la modulation de son expression par la suppression des androgènes
- (iii) Déterminer son rôle dans la résistance à la chimiothérapie par docétaxel
- (iv) Etudier le lien entre score urinaire PCA3 et significativité du CaP

Matériels et Méthodes : L'expression de la β III-tubuline a été étudiée par immunohistochimie dans le tissu tumoral de 3 cohortes de patients, à différents stades du cancer de prostate. La modulation de l'expression de la β III-tubuline par la suppression des androgènes a été étudiée dans des modèles *in vitro* (lignées cellulaires), et *in vivo* (xénogreffe sur souris athymique). La sensibilité des lignées cellulaires à la chimiothérapie par docétaxel a été étudiée : (i) sur lignées parentales ; (ii) après sur-expression de la β III-tubuline par transfection du gène; et (iii) après extinction de son expression par ARN interférence. La corrélation entre score urinaire PCA3 et significativité du CaP a été testée dans une cohorte prospective de patients opérés, répondant à des critères initiaux de surveillance active.

Résultats : L'expression de la β III-tubuline était retrouvée dans 16,7% des cas de cancers de prostate localisés et était significativement corrélée aux facteurs de mauvais pronostic. Son expression était un facteur prédictif indépendant de récurrence biologique après prostatectomie totale. Au stade de résistance à la castration, son expression était significativement plus importante dans le tissu cancéreux. Les expériences *in vitro* sur lignées cellulaires, et *in vivo* sur modèle murin confirmaient le lien entre suppression des androgènes et sur-expression de la β III-tubuline. La sur-expression de la β III-tubuline dans les lignées cellulaires conférait aux cellules une plus grande résistance au docétaxel. A l'inverse, les expériences d'extinction de son expression par ARN interférence montraient une plus grande sensibilité des cellules transfectées. Les données cliniques montraient que l'expression de la β III-tubuline dans le tissu tumoral était associée à une diminution de la survie globale chez les patients traités par docétaxel. Le score PCA3 était significativement corrélé au volume tumoral. Un score PCA3 <25 était un facteur prédictif indépendant en analyse multivariée d'un volume tumoral < 0,5 ml et de la présence d'un CaP non significatif.

Conclusions : Au stade du diagnostic d'un CaP localisé, l'utilisation comme critère d'inclusion dans des protocoles de surveillance active du critère PCA3 <25 permettrait de mieux identifier les cancers non significatifs. A l'inverse, l'expression de la β III-tubuline dans le tissu cancéreux prostatique est associée aux facteurs de mauvais pronostic et à la récurrence biologique après prostatectomie totale. Dans l'histoire naturelle de la maladie prostatique en récurrence ou d'emblée métastatique, la β III-tubuline est sur-exprimée en réponse au traitement hormonal. La β III-tubuline joue un rôle important dans la chimiorésistance au docétaxel, et est un facteur prédictif de survie chez les patients traités par docétaxel.